



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

MARIANNA SAMPAIO SERPA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO DO
TIPO UROQUINASE E SEU RECEPTOR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
LÍNGUA ORAL E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

NATAL/RN

2016

MARIANNA SAMPAIO SERPA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO DO
TIPO UROQUINASE E SEU RECEPTOR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
LÍNGUA ORAL E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral
da Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Patologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

NATAL/RN

2016

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia
Biblioteca Setorial de Odontologia “Profº Alberto Moreira Campos”.

Serpa, Marianna Sampaio.

Expressão imuno-histoquímica do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase e seu receptor em carcinoma epidermoide de língua oral e sua relação com parâmetros clínico-patológicos / Marianna Sampaio Serpa. – Natal, RN, 2016.

99 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Odontologia.

1. Carcinoma de células escamosas – Dissertação. 2. Imuno-histoquímica – Dissertação. 3. Ativador de plasminogênio tipo uroquinase – Dissertação. 4. Receptores de Ativador de Plasminogênio Tipo Uroquinase – Dissertação. I. Pinto, Leão Pereira. II. Título.

RN/UF/BSO

Black D65

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 12 de fevereiro de 2016, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro

Universidade Federal de Campina Grande

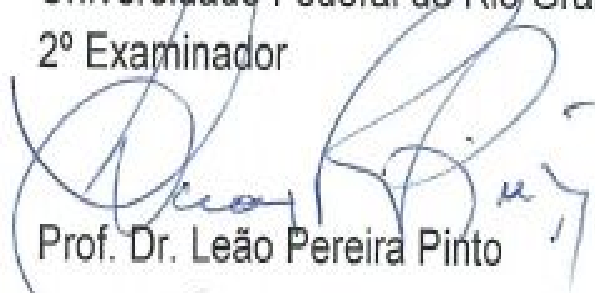
1º Examinador



Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

2º Examinador



Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

3º Examinador

DEDICATÓRIA

Com muito amor, dedico este trabalho...

*Aos meus pais, **Ricardo e Margarete**, por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos, e nunca poupar esforços para que eles sejam realizados. Sem vocês, eu nada seria.*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre me acompanhar, me iluminando e me tranquilizando nos momentos de inquietude e dúvidas. Ao Senhor devo todas as minhas benções e vitórias.

Aos meus pais, **Ricardo e Margarete**, por serem meus maiores torcedores e terem me ensinado os verdadeiros valores da vida. Obrigada por me apoiarem a cada passo e vibrarem comigo cada vitória como se fosse as suas, que na verdade não deixam de ser. Obrigada por compreenderem minha ausência, mas saiba que sempre levo vocês aonde quer que eu vá. A vocês, minha maior gratidão.

Aos meus irmãos, **Viviane**, uma verdadeira guerreira e a quem tenho maior admiração. Sua atenção, gentileza e amor para com todos são admiráveis e atitudes dignas de serem seguidas. Obrigada por compreender minha ausência em momentos tão difíceis e mesmo assim sempre se preocupar e torcer por mim; **Manuella** por toda cumplicidade, risadas e amor, com certeza sua companhia diária é uma das coisas que mais senti falta durante esses dois anos de mestrado. Obrigada por mesmo não entendendo como eu gosto tanto de estudar sempre me apoiar e me incentivar; **Carlos, João Marcelo e Tatiana**, por todo apoio e carinho mesmo cada um morando tão longe um do outro.

A **André**, o grande amor da minha vida, que sempre me apóia e provavelmente meu maior torcedor depois dos meus pais. Agradeço imensamente por todo o carinho e amor que você me dá diariamente, por todo companheirismo e por todas as risadas que só você soube arrancar de mim quando estava preocupada ou estressada durante a execução deste trabalho. Obrigada por entender minha ausência, e compreender como a realização deste mestrado era importante para mim. Sem você com certeza esses dois anos teriam sido mais difíceis.

À minha avó **Marluce**, pelo exemplo de determinação e pelos valores ensinados. Agradeço imensamente todas as orações, ensinamentos e incentivos para seguir a carreira acadêmica. À minha avó **Helena (in memorian)** por todos os momentos de descontração e histórias compartilhadas.

Aos meus sobrinhos lindos, **Biel, Clarinha e Sofia**, por mesmo não sabendo me descontraíam e trouxeram tanta alegria em momentos de preocupação com algum trabalho.

Às minhas amigas de longa data, **Gabriela, Iolanda, Luciana, Marília e Polyana**, por mesmo longe torcerem pelo meu sucesso e felicidade.

Aos demais familiares e amigos, por toda ajuda e amor.

Ao meu orientador, **Dr. Leão Pereira Pinto**, pelos valiosos ensinamentos ao longo do mestrado os quais sempre levarei comigo. Serei eternamente grata por toda confiança, que o senhor depositou em mim na execução desta Dissertação. Agradeço imensamente por todos os conselhos e também por todas as conversas descontraídas e risadas. Seu amor pela docência é algo encantador e admirável, e um dia espero, sinceramente, conseguir inspirar meus alunos como o senhor me inspira.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, **Dra. Lélia Batista de Souza**, a quem tenho grande admiração pelo amor e dedicação ao exercício da profissão. Obrigada por todos os aprendizados, disponibilidade e correções sugeridas no exame de Qualificação deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral pela dedicação que têm a este programa e por todos os aprendizados ao longo desses dois anos de mestrado. À **Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira**, pelo amor que tem a profissão, pelos ensinamentos tanto em sala de aula como na Clínica de Estomatologia, pela disponibilidade em ajudar e sugestões na correção deste trabalho. À **Dra. Hébel Cavalcanti Galvão**, por todo o carinho e convívio agradável. À **Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz**, pela simplicidade e momentos de descontração. À **Dra. Roseana de Almeida Freitas**, pelo exemplo de comprometimento com a profissão e todo conhecimento compartilhado. À **Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel**, por sempre nos estimular a estudar e pesquisar. Ao **Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa**, pelo alegre convívio e simpatia. À **Dra. Ana Myriam Costa de Medeiros e Dra. Patrícia Teixeira de Oliveira**, por toda a ajuda e aprendizado na Clínica de Estomatologia.

À **Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro**, minha primeira orientadora e quem despertou em mim o interesse pela pesquisa e docência. Obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar a seguir a carreira acadêmica. Agradeço imensamente todos os conselhos e ensinamentos compartilhados ao longo de todos esses anos.

Aos meus queridos amigos da turma de mestrado, pela convivência harmoniosa ao longo desses dois anos. Com certeza aprendi muito com cada um de vocês. **A Amanda**, você é um exemplo de determinação, dedicação e integridade; **Angélica**, por todas as risadas e histórias compartilhadas ao longo das inúmeras viagens de carro que fizemos para Recife. Sua alegria é contagiante; **Eduardo**, seu jeito tranquilo e simplório com certeza vão me fazer falta; **Hugo**, minha eterna duplinha, obrigada por todas as gargalhadas, cumplicidade e claro, por todas as cervejinhas ao fim de um dia difícil. Tenho certeza que nossa amizade vai perdurar; **Jefferson**, que conheci desde meu estágio na Polícia Militar em Recife e nunca imaginei que

seríamos colegas de turma e mais ainda, amigos; **Leorik**, uma das pessoas mais inteligentes e determinadas que conheço e que além de tudo tem um coração de ouro. Obrigada pelas risadas e carinho. Nunca esquecerei nossas madrugadas de muito estudo e café; **Luiz Arthur**, por todas as risadas e jeito avassalador com que leva a vida; **Mara**, seu jeito forte e seguro de si mesma são admiráveis; **Patrícia**, pelo jeito simples e sereno, sempre disposta a ajudar; **Rodrigo**, meu irmãozinho patológico, a quem devo tanta ajuda na execução deste trabalho e com quem eu aprendi tanto. Obrigada por tudo; **Thalita**, pelo seu jeito determinado e por todos os momentos de descontração e risadas.

Aos doutorandos, **Ana Luiza, Andréia, Denise, Jadson, Jamile, Laudénice, Laura, Luciana, Marcelo, Natália, Rafaela, Roseane, Tiago e Viviane**, pelas diversas vezes que me tiraram dúvidas e pelo alegre convívio. Agradeço, em especial, a **Maria Luiza** pela disponibilidade de tempo para me ajudar diversas vezes e sempre fazer isso com o maior prazer do mundo, a **Salomão** pela realização da estatística deste trabalho, a **Melka**, sempre espirituosa e divertida que me ajudou bastante neste trabalho e a **Clarissa**, minha irmã patológica que sempre se mostrou disposta a me ajudar e me ensinar.

Aos integrantes da Arquivologia, **Melka, Thalita, Luiz Arthur e Rodrigo**. Sem esta “disciplina” com certeza a coleta de dados para esta dissertação não teria sido tão eficaz e prazerosa.

Aos funcionários **Hévio, Ricardo e Sandrinha**, pela ajuda laboratorial no processamento das lâminas que foi essencial para a realização desta dissertação.

Às funcionárias da Patologia Oral, **Idel, Graçinha e Lourdinha**, e da Clínica de Estomatologia, **Patrícia**, por toda a competência, presteza e responsabilidade, proporcionando o bom funcionamento do programa.

Aos funcionários do Hospital Luiz Antônio da Liga Norte-Rio-Grandense, em especial, a **Eduardo, Mychelle e Najara**, por toda disponibilidade e auxílio fundamental na coleta de dados clínicos e do material biológico.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro que me possibilitou a realização deste curso.

“As coisas tangíveis tornam-se insensíveis à palma da mão. Mas as coisas findas, muito mais que lindas, essas ficarão.”

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

O carcinoma epidermoide (CE) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral (CEO), apresentando uma alta taxa de mortalidade. Devido a isto, a descoberta de biomarcadores que facilitem a compreensão do comportamento biológico desse tumor e aprimorem o tratamento é necessário. O ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) e o seu receptor, uPAR, têm se destacado por atuarem na proteólise de estruturas da membrana basal e matriz extracelular, facilitando a invasão tumoral. O presente estudo se propôs a avaliar a imunexpressão dessas proteínas em 46 casos de carcinoma epidermoide de língua oral (CELO). Esses resultados foram relacionados com a presença de metástase, estadiamento clínico TNM, recidiva locorregional, desfecho da lesão e gradação histológica de malignidade. A imunomarcção de cada caso foi avaliada semiquantitativamente, tanto no *front* de invasão como no centro do tumor, na qual foram atribuídos os escores: 0 (0% de células positivas), 1 (1-10% de células positivas), 2 (11-50% de células positivas), 3 (mais de 50% de células positivas). A expressão do uPA foi observada em 93,5% (n=43) dos casos no *front* de invasão, com predomínio do escore 2 (n=16; 34,8%), e em 67,4% (n=31) dos casos no centro do tumor, com predomínio do escore 1 (n=15; 32,6%). De modo geral, a imunexpressão do uPA não mostrou associação com os parâmetros clínicos analisados. Em relação à gradação histológica, foi observada uma maior expressão de uPA nos casos de alto grau de malignidade em relação aos de baixo grau de malignidade ($p=0,05$). Quando analisado em relação aos parâmetros morfológicos, foi identificado uma maior expressão do uPA nos casos de pior padrão de invasão ($p=0,03$). A expressão do uPAR foi observada em 73,9% (n=34) dos casos no *front* de invasão, com predomínio do escore 1 (n=21; 45,6%), e em 47,5% (n=21) dos casos no centro do tumor, com predomínio do escore 0 (n=25; 54,4%). Embora não tenham sido observadas significâncias estatísticas em relação à metástase linfonodal, estadiamento clínico TNM, desfecho e gradação histológica, houve uma maior expressão do uPAR nos casos com recidiva locorregional em relação aos sem recidiva ($p=0,04$). Em relação à análise da localização intratumoral, foi observada uma maior expressão de uPA e uPAR no *front* de invasão em relação ao centro do tumor ($p<0,001$). Na correlação entre uPA e uPAR, não foi observada significância estatística. Com base nestes resultados, sugere-se que o uPA e uPAR estejam envolvidos na progressão do CELO, atuando principalmente na região mais profunda do tumor.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas; imuno-histoquímica; ativador de plasminogênio tipo uroquinase; receptores de ativador de plasminogênio tipo uroquinase.

ABSTRACT

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignancy of the oral cavity (OSCC), with a high mortality rate. Due to this, the discovery of biomarkers that facilitate the understanding of the biological behavior of the tumor and improve treatment is necessary. Urokinase type plasminogen activator (uPA) and its receptor, uPAR, are responsible for the proteolysis of structures of the basement membrane and extracellular matrix, facilitating tumor invasion. This study aims to assess the immunoexpression of these proteins in 46 cases of squamous cell carcinoma of the oral tongue (OTSCC). These results were related to the presence of metastasis, clinical TNM staging, locoregional recurrence, outcome of the lesion and histological grading. Immunostaining of each case was evaluated semiquantitatively, in the front of invasion and center of the tumor, in which scores were assigned: 0 (0% of positive cells), 1 (1-10% of positive cells), 2 (11 -50% positive cells) and 3 (more than 50% positive cells). The expression of uPA was observed in 93.5% (n=43) of the cases in the front of invasion, with predominance of score 2 (n=16; 34.8%) and in 67.9% (n=31) of the cases in the center of the tumor, with predominance of score 1 (n=15; 32.6%). Overall, the immunoexpression of uPA was not associated with clinical parameters. Regarding the malignant histological grading, a higher expression of uPA was observed in cases of high-grade malignancy compared to low-grade malignancy ($p=0.05$). Regarding the morphological parameters, increased expression of uPA was observed in the worst mode of invasion ($p=0.03$). The expression of uPAR was observed in 73.9% of cases in the front of invasion, with a predominance of score 1 (n=21; 45.6%), and in 47.5% (n=21) of the cases in the center of the tumor, with a predominance of score 0 (n=25; 54.4%). Although no statistical differences were observed in relation to lymph node metastasis, clinical TNM staging, outcome, and histological grading, there was a higher expression of uPAR in cases with locoregional recurrence ($p=0.04$). Regarding the tumor intra-localization, it was observed an increased expression of uPA and uPAR at the front of invasion in relation to the center of the tumor ($p<0.001$). Regarding the correlation between uPA and uPAR, there was no statistical significance. Based on these results, it is suggested that uPA and uPAR are involved in the progression of CELO, mainly in the deeper region of the tumor.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; immunohistochemistry; urokinase type plasminogen activator; urokinase type plasminogen activator receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura do uPA.....	33
Figura 2	Estrutura do uPAR.....	34
Figura 3	Representação da ligação uPA/uPAR.....	36
Quadro 1	Sistema de estadiamento clínico TNM para o CEO, preconizado por SOBIN WITTEKIND (2002).....	46
Quadro 2	Categorias de estadiamento clínico TNM para o CEO, preconizado por SOBIN, WITTEKIND (2002).....	47
Quadro 3	Sistema de gradação histológica de malignidade proposto por Bryne (1998).....	48
Quadro 4	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	50
Figura 4	Fotomicrografia demonstrando os aspectos morfológicos do CELO de alto grau de malignidade (H/E; Barra=200µm).....	55
Figura 5	Fotomicrografia demonstrando os aspectos morfológicos do CELO de baixo grau de malignidade (H/E; Barra=500µm).....	55
Figura 6	Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPA no <i>front</i> de invasão e centro do tumor em CELO (Hidéf; Barra=200µm).....	61
Figura 7	Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPA no <i>front</i> de invasão em CELO (Hidéf; Barra=200µm).....	61
Figura 8	Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPAR no <i>front</i> de invasão e centro do tumor em CELO (Hidéf; Barra=500µm).....	67
Figura 9	Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPAR em CELO no <i>front</i> de invasão (Hidéf; Barra=100µm).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil morfológico dos 46 casos de CELO. Natal-RN, 2016.....	54
Tabela 2	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação à metástase linfonodal. Natal, RN - 2016.....	56
Tabela 3	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação ao estadiamento clínico TNM. Natal, RN - 2016.....	57
Tabela 4	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação à recidiva. Natal, RN – 2016.....	58
Tabela 5	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação ao desfecho. Natal, RN – 2016.....	58
Tabela 6	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação à gradação histológica de malignidade de Bryne (1998). Natal, RN - 2016.....	59
Tabela 7	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA no <i>front</i> de invasão em relação aos parâmetros morfológicos da gradação histológica de de Bryne (1998). Natal, RN - 2016.....	60
Tabela 8	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPAR no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação a metástase linfonodal. Natal, RN - 2016.	62

Tabela 9	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPAR no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação ao estadiamento clínico TNM. Natal, RN - 2016.....	63
Tabela 10	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPAR no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação à recidiva. Natal, RN - 2016.....	64
Tabela 11	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPAR no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação ao desfecho. Natal, RN – 2016.....	64
Tabela 12	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPAR no <i>front</i> de invasão e no centro do tumor em relação a gradação histológica de Bryne. Natal, RN - 2016.....	65
Tabela 13	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPAR no <i>front</i> de invasão em relação aos parâmetros morfológicos da gradação histológica de de Bryne (1998). Natal, RN - 2016.....	66
Tabela 14	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, e significância estatística (<i>p</i>) para a imunopositividade para uPA e uPAR em relação ao <i>front</i> de invasão e centro do tumor. Natal, RN – 2016.....	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Do inglês, <i>protein kinase B</i> , traduzido como proteína quinase B
CE	Carcinoma epidermoide
CELO	Carcinoma epidermoide de língua oral
CEO	Carcinoma epidermoide oral
CO	Câncer oral
c-Src	Refere-se à proteína tirosina quinase citoplasmática
EGF	Do inglês, <i>epidermal growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento epidérmico
EGFR	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i> , traduzido como receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , traduzido como ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Do inglês, <i>extracellular-signal-regulated kinase</i> , traduzido como quinase regulada por sinal extracelular
FAK	Do inglês, <i>focal adhesion kinase</i> , traduzido como quinase de adesão focal
FGF	Do inglês, <i>fibroblastic growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento fibroblástico
GPI	Do inglês, <i>glycosylphosphatidylinositol</i> , traduzido como glicosilfosfatidilinositol
HE	Refere-se à técnica histoquímica da hematoxilina e eosina
HPV	Do inglês, <i>human papillomavirus</i> , traduzido como papiloma vírus humano
INCA	Instituto nacional de câncer
K	Do inglês, <i>kringle domain</i> , traduzido como domínio kringle
MAPK	Do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i> , traduzido como proteína quinase ativada por mitógeno
MMP	Do inglês, <i>matrix metalloproteinase</i> , traduzido como metaloproteínase da matriz
mRNA	Do inglês, messenger ribonucleic acid, traduzido como ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD	Do inglês, <i>protease domain</i> , traduzido como domínio da protease
PAI	Do inglês, <i>plasminogen activator inibidor</i> , traduzido como inibidor do ativador de plasminogênio
PAS	Do inglês, <i>plasminogen activator system</i> , traduzido como sistema ativador de plasminogênio
PCR-RFLP	Do inglês, <i>polymerase chain reactionrestriction fragment length polymorphism</i> , traduzido como polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase
PI3K	Do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase</i> , traduzido como fosfatidilinositol 3-

	quinase
PLAU	Do inglês, <i>plasminogen activator, urokinase (gene)</i> , traduzido como ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (gene)
PLAUR	Do inglês, <i>plasminogen activator, urokinase receptor (gene)</i> , traduzido como receptor de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (gene)
pro-uPA	Do inglês, <i>pro-urokinase plasminogen activator</i> , traduzido como pró-ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
RT-PCR	Do inglês, <i>real-time polymerase chain reaction</i> , traduzido como reação em cadeia da polimerase em tempo real
suPAR	Do inglês, <i>soluble urokinase plasminogen activator receptor</i> , traduzido como ativador de plasminogênio do tipo uroquinase solúvel
TA	Temperatura ambiente
TEM	Do inglês, <i>epithelial-mesenchymal transition</i> , traduzido como transição epitélio-mesênquima
TGF- β	Do inglês, <i>transforming growth factor beta</i> , traduzido como fator transformador de crescimento- β
TNM	Do inglês, <i>Tumor-Node-Metastasis</i> , refere-se ao sistema de estadiamento clínico que avalia o tamanho do tumor, envolvimento do linfonodo regional e envolvimento por metástase à distância
TRIS-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
tPA	Do inglês, <i>tissue plasminogen activator</i> , traduzido como ativador de plasminogênio do tipo tecidual
uPA	Do inglês, <i>urokinase plasminogen activator</i> , traduzido como ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
uPAR	Do inglês, <i>urokinase plasminogen activator receptor</i> , traduzido como receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
UV	Ultravioleta
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL	28
2.2	UPA e UPAR	33
2.2.1	Estrutura e função	33
2.2.2	uPA e uPAR no câncer	37
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	44
4.3	POPULAÇÃO	44
4.4	AMOSTRA	44
4.4.1	CrITÉrios de inclusão da amostra	44
4.4.2	CrITÉrios de exclusão da amostra	45
4.5	ESTUDO CLÍNICO	45
4.6	ESTUDO MORFOLÓGICO	47
4.7	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	49
4.7.1	Método imuno-histoquímico	49
4.7.2	Análise do perfil imuno-histoquímico	50
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5	RESULTADOS	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	53
5.2	ASPECTOS MORFOLÓGICOS	53
5.3	RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	56
5.3.1	Análise da imunexpressão de uPA	56
5.3.2	Análise da imunexpressão de uPAR	62
5.3.3	Avaliação entre a imunexpressão dos marcadores em relação à localização..	68
5.3.4	Avaliação da correlação entre os marcadores	68
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	78

APÊNDICES.....	89
ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide (CE) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral (CEO), representando cerca de 90% de todos os tumores malignos que acometem esta região anatômica. Embora sua incidência varie dependendo da localização geográfica, é aceito, de modo geral, que esteja entre o sexto e o nono tipo de câncer mais ocorrente (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011). A língua é o sítio anatômico mais acometido pelo CEO, e também considerado o de pior prognóstico, quando comparado a outras localizações, devido à alta frequência de metástase linfonodal (BELLO; SOINI; SALO, 2010).

Apesar de frequente, apenas 15 a 50% dos pacientes com CEO apresentam uma taxa de sobrevida superior a 5 anos. Tal fato ocorre, principalmente, devido ao diagnóstico tardio e tratamentos inespecíficos, associados ao alto risco de recorrência e metástase nos linfonodos cervicais (WARNAKULASURIYA, 2009; MCCULLOUGH; PRASAD; FARAH, 2010). Devido a isto, diversos estudos vêm sendo realizados a cerca do uso de biomarcadores para melhor compreender o comportamento biológico desse tumor e aprimorar o tratamento tornando-o mais eficaz e específico. Neste contexto, continuados estudos envolvendo proteínas que estão associadas à invasão estão sendo realizados. Dentre elas, tem se destacado os componentes do sistema ativador de plasminogênio (PAS).

O PAS participa na conversão da pró-enzima plasminogênio na serina protease plasmina (BAKER et al., 2007). Inicialmente acreditava-se que a plasmina atuava somente na fibrinólise de coágulos sanguíneos e restauração do fluxo sanguíneo, porém, atualmente, sabe-se que, além disso, ela atua fisiologicamente e patologicamente em vários outros processos, que incluem: a migração celular, cicatrização, angiogênese e invasão de células tumorais (DUFFY; DUGGAN, 2004; ULISSE et al., 2009). Na carcinogênese, é reconhecido que a plasmina possui a capacidade de degradar diretamente componentes da membrana basal e matriz extracelular intersticial como, por exemplo, a laminina, colágeno do tipo IV e fibronectina e indiretamente, ativar outras proteinases como as metaloproteinases de matriz (MMPs), ocasionando a invasão e crescimento tumoral (LIJNEN, 2001; DEL ZOPPO, 2010).

Componentes do PAS responsáveis pela formação de plasmina incluem dois tipos de ativadores: o tipo tecidual, tPA, e o tipo uroquinase, uPA. O tPA atua exclusivamente na fibrinólise, e o uPA, se liga ao seu receptor específico, uPAR, e atua principalmente na cicatrização tecidual (AISINA; MUKHAMETOVA, 2014; MEKKAWAY; POURGHOLAMI; MORRIS, 2014). Porém, diversos estudos na literatura tem associado à

superexpressão do uPA/uPAR a diversos tumores malignos, como os carcinomas de mama (JELISAVAC-COSIC et al., 2011), estômago (LAERUM et al., 2012), colorretal (BOONSTRA et al., 2014) e ovário (DORN et al., 2011).

Em CEOs, já foi observado uma superexpressão de uPA e/ou uPAR (YOSHIZAWA et al. 2011; ZHANG et al. 2011; MAGNUSSEN et al. 2014), embora exista a necessidade de melhor elucidar o papel dessas proteínas no carcinoma epidermoide restritos a língua oral (CELO), visto o alto grau de acometimento e agressividade da lesão. Desta forma, este estudo se propôs a avaliar a imunoexpressão do uPA e uPAR em CELO, com o objetivo de relacionar esses resultados aos aspectos clínico-patológicos. Por meio desta investigação, pretendeu-se obter dados que contribuam no entendimento do papel destas proteínas na agressividade da lesão estudada e, assim, facilitar a compreensão do comportamento biológico dessa neoplasia maligna.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

O câncer oral (CO) é a neoplasia maligna que acomete a cavidade bucal e que, devido a sua alta taxa de mortalidade, é considerado um grande problema de saúde pública (BHATTACHARYYA; NAYAK, 2005; WARNAKULASURIYA, 2009). O Brasil é um dos países com uma das maiores incidências da doença, sendo estimados, para o ano de 2016, 11.140 novos casos no sexo masculino e 4.350 no sexo feminino. No nordeste, foi previsto que ele representaria 3,6% e 2,2% de todas as neoplasias malignas em homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2016).

O CEO, também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, representa mais de 90% dos casos de CO. Trata-se de uma neoplasia maligna originada do epitélio pavimentoso estratificado que afeta desde os lábios até a cavidade oral propriamente dita (TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002). Mundialmente há cerca de 275.000 novos casos de CEO por ano situando-se, de modo geral, entre o sexto e nono tipo de câncer mais ocorrente. Em determinados locais, como no Sudeste da Ásia, esta neoplasia chega a ser o tipo de câncer mais frequente (WARNAKULASURIYA, 2009; JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011).

Na América do Sul, o Brasil é o país com a maior incidência de CO e, em relação à outros continentes, a população masculina brasileira tem maior risco de desenvolver o CO depois da Índia e da França. De modo semelhante a outros países, no Brasil a incidência de novos casos também é bastante heterogênea, ocorrendo cerca de 30% dos casos em capitais (WARNAKULASURIYA, 2009). Segundo dados do INCA (2014), o estado onde o sexo feminino é mais acometido é o Rio de Janeiro, seguido do Espírito Santo, Paraíba e o Rio Grande do Norte. Em relação ao sexo masculino, sua maior incidência é no Rio de Janeiro, seguida do Espírito Santo, São Paulo e Rio Grande do Sul.

De modo geral a incidência do CEO aumenta com a idade, sendo a maior parte dos casos em pacientes acima dos 40 anos (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; RIVERA; VENEGAS, 2014). Entretanto, dados epidemiológicos dos últimos 20 anos vêm mostrando o crescimento dessa neoplasia em adultos jovens (18-45 anos de idade), parecendo estes casos estarem particularmente associado ao papiloma vírus humano (HPV)

(GORSKY et al., 2004; OLIVEIRA; SILVA; ZUCOLOTO, 2006; CHATURVEDI et al., 2008).

A carcinogênese oral, assim como o câncer em geral, é um processo complexo e multifásico que requer a desestabilização de vários sistemas de controle e reparo que coordenam o comportamento das células, envolvendo a ativação sequencial de oncogenes e, inativação de genes supressores de tumores (SCHLIEPHAKE, 2003; BETTENDORF; PIFFKÔ; BÁNKFALVI, 2004). Tanto fatores extrínsecos como os intrínsecos podem estar envolvidos nesse processo. Os fatores extrínsecos incluem agentes externos como o tabaco, álcool, infecções por vírus oncogênicos, a exemplo o HPV que estão particularmente associados aos casos de carcinomas de orofaringe, e radiação solar ultravioleta (UV), sendo este associado, somente, ao carcinoma epidermoide (CE) de lábio. Já os fatores intrínsecos incluem alterações genéticas, deficiências nutricionais e o estado imunológico (NEVILLE et al., 2009; SCULLY; BAGAN, 2009).

A associação do tabaco ao surgimento do CEO já esta bem estabelecida na literatura. Estudos mostram que a proporção de tabagistas entre os pacientes com CEO é de 75%. Além do mais, o risco de desenvolvê-lo aumenta conforme o número de cigarros fumados por dia, tipo de fumo e tempo de uso (MARKOPOULOS, 2012; STINGONE et al., 2013; QUADRI et al., 2015). Por exemplo, o cachimbo e o charuto parecem oferecer um risco maior para o desenvolvimento do CEO quando comparado ao uso do cigarro, assim como, o risco é de pelo menos cinco vezes maior para pessoas que fumam 40 cigarros/dia, porém aumenta para 17 vezes em pessoas que fumam 80 cigarros/dia (NEVILLE et al., 2009).

Segundo alguns autores ainda é preciso que ocorra uma associação entre os fatores, tendo em vista que o CEO é uma neoplasia de etiologia multifatorial. Já foi demonstrado, por exemplo, que a associação de tabaco e álcool é considerada de grande risco ao CEO, tendo um paciente etilista e tabagista 15 vezes mais chances de desenvolver esse câncer do que aquele que não fuma e não faz uso de bebidas alcoólicas (BUNDGAARD; BENTZEN; WILDT, 1994; SCULLY; BAGAN, 2009).

No que concernem aos achados clínicos, o CEO possui diferentes manifestações que variam segundo a progressão da doença. Fases mais iniciais tendem a ter um aspecto leucoplásico, eritroplásico e eritroleucoplásico, enquanto que em fases mais avançadas ele se apresenta como uma lesão ulcerada, circundada por bordas elevadas e aspecto irregular com endurecimento, ou ainda como uma lesão exofítica de superfície irregular, vegetante, papilar ou verruciforme de cor normal, vermelha ou branca (NEVILLE; DAY, 2002, NEVILLE et al., 2009).

Os sítios anatômicos mais comuns são a língua, o assoalho bucal e lábios, e pode ainda ocorrer em mucosa jugal, região retromolar, palato e gengiva (NEMES et al., 2008; JERJES et al., 2010). O CE de língua, particularmente, corresponde, em geral, a 25%-40% de todos os casos de CEO (NEVILLE; DAY, 2002; KADEMANI et al, 2007). Estudos epidemiológicos mostram que sua incidência é maior em países da Europa e nos Estados Unidos da América, e que junto com o CE de assoalho bucal, correspondem a mais de 50% dos casos de CEO. Por outro lado, em outros lugares como no sudeste da Ásia, a incidência do CEO é mais alta em região de comissura labial e mucosa jugal (BOYLE et al., 1990; EZZAT et al., 1996; WARNAKULASURIYA, 2009).

Em um mesmo sítio anatômico a área acometida pelo tumor difere de lesão para lesão. No CE de língua, por exemplo, 55%-70% dos casos ocorrem na região pôstero-lateral, 20% ocorrem nas superfícies ântero-lateral ou ventral, 4% em dorso e cerca de um terço dos casos em base da língua (KRUPALA; GIANOLI, 1993; GORSKY et al., 2004; NEVILLE et al., 2009).

A localização anatômica tem sido considerada como um indicador de prognóstico, visto que o tumor tem um comportamento diferente na dependência da região anatômica em que se desenvolve. Segundo Araújo Júnior et al. (2008) e Shaw et al. (2009), lesões de CEO em lábio inferior são mais comumente diagnosticadas em estágios iniciais, enquanto que lesões em língua, assoalho bucal e palato, normalmente são diagnosticadas em estágios avançados, inclusive com maior probabilidade de desenvolver metástases cervicais. Os autores ainda afirmam que os casos de CE em base de língua são diagnosticados comumente em fase tardia devido à difícil visualização da lesão que normalmente se mostra assintomática, apresentando um prognóstico ainda mais sombrio do que quando comparado a outras áreas da língua.

Histologicamente, o CEO é caracterizado por uma proliferação de células epiteliais malignas dispostas isoladamente, em ilhas e/ou cordões que invadem o tecido conjuntivo. As células neoplásicas exibem pleomorfismo nuclear e celular, hipercromatismo, aumento da relação núcleo-citoplasma, figuras de mitoses, algumas das quais atípicas, ceratinização individual e formação de perólas de ceratina. Ainda pode ser observada invasão neural, angiolinfática e muscular (NEVILLE et al., 2009).

Com o intuito de caracterizar as neoplasias malignas para com isso ajudar a estimar o prognóstico e propor uma melhor forma de tratamento, criou-se o sistema de estadiamento clínico TNM (WEBBER et al. 2014). Este foi primeiramente descrito por Pierre Denoix, entre os anos 1943 e 1952 e, atualmente, é universalmente aceito encontrando-se em sua sexta

edição. Ele é baseado na avaliação de três componentes: tamanho do tumor no sítio primário (T); grau de envolvimento de linfonodos regionais (N); e ausência ou presença de metástase à distância (M). A adição de números a estes três componentes indica detalhadamente a extensão da lesão maligna. Uma vez que o TNM do paciente é estabelecido, para facilitar a análise, o estadiamento é reduzido a um estágio [I, II, III, IV (IVa, IVb e IVc)] (SOBIN; WITTEKIND, 2002).

Apesar de diversos estudos na literatura (BUNDGAARD et al., 2002; ARAÚJO JÚNIOR; COSTA; RAMOS, 2006; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2008) terem correlacionado estatisticamente o TNM com o prognóstico do CEO, em outros trabalhos ele se mostrou falho (O-CHAROENRAT et al., 2003; BETTENDORF; PIFFKÔ; BÁNKFALVI, 2004). Isto se deve, em parte, porque em estágios iniciais do tumor a palpação no pescoço para detectar linfonodos, dá falso negativo em 30% dos casos, devido a sua pequena dimensão (KANTOLA et al., 2000). Por isto, é recomendado utilizar meios auxiliares como tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassonografia para detectar possíveis metástases cervicais, mas, mesmo assim, cerca de ¼ das micrometástases ainda passam despercebidas (VAN DEN BREKEL; CASTELIINS; SNOW, 1998; SPARANO et al., 2004).

Na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes surgiram os sistemas de gradação histológica de malignidade para o CEO. A gradação histopatológica de Broders (1920) foi a primeira proposta, sendo seguida por diversos outros autores, incluindo a de Anneroth e Hansen (1984), Bryne et al. (1989), a da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005) e a de Brandwein-Gensler et al. (2005).

O sistema de gradação de Bryne et al. (1989), também denominado sistema de gradação das margens invasivas, propôs que apenas a área mais invasiva do tumor, posteriormente denominada *front* de invasão, deveria ser considerada para ditar o comportamento clínico do CEO. Foram considerados parâmetros histológicos o grau de ceratinização, pleomorfismo celular, intensidade do infiltrado inflamatório, padrão de invasão e número de mitoses. Cada um desses parâmetros recebeu um escore que ao final da análise é somado, fornecendo o grau de malignidade do tumor. Em 1992, Bryne et al. aprimoraram o sistema de gradação histopatológica, retirando o parâmetro “figuras de mitose” por haver discordâncias entre examinadores e variações no tamanho dos campos com maior aumento nos microscópios. E, em 1998, Bryne reiterou que o *front* de invasão reflete bem o prognóstico desses tumores considerando que a interface tumor-hospedeiro, caracteriza o

aumento de proliferação celular, perdas e ganhos de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas e angiogênese.

O valor da gradação histológica proposta por Bryne (1998), foi avaliada por diversos autores como Costa, Araújo Júnior e Ramos (2005) que analisaram a esta gradação em 38 casos de CEO, buscando correlacioná-la ao estadiamento clínico TNM. Os autores observaram uma associação estatisticamente significativa entre o estadiamento clínico TNM e o grau de malignidade do tumor, assim como com os parâmetros morfológicos (grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório), indicando que as áreas invasivas podem ser primariamente responsáveis pelo comportamento clínico do tumor, o que poderia servir de grande valia para a escolha da terapia do CEO. Kurokawa et al. (2006) e Larsen et al. (2009) também observaram resultados semelhantes reforçando que a gradação histológica de Bryne deve ser considerada um importante indicador de prognóstico. Por outro lado, outros estudos não encontram associação dessa gradação com as variáveis clínicas como metástase linfonodal, estadiamento clínico TNM e desfecho (LINDENBLATT et al. 2012; CALDEIRA, SOUSA E AGUIAR, 2015).

O tratamento de escolha do CEO depende na sua extensão e, particularmente, da habilidade do cirurgião em realizar uma ressecção completa. Metástases regionais têm sido associadas a tumores maiores, altas taxas de recorrências e prognóstico sombrio. Por isto, alguns estudos recomendam a dissecação cervical profilática, mesmo na ausência de metástases clinicamente identificáveis. Tal recomendação é considerada especialmente no CE de língua que é o tipo de CEO com as maiores taxas de mortalidade, apresentando uma sobrevida de cinco anos inferior a 50% (WARNAKULASURIYA, 2010; TAN et al., 2012; YUASA-NAKAGAWA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014). Tal fato ocorre porque histologicamente a língua apresenta uma rica rede linfática e extensa área muscular que facilita a ocorrência de invasão local e metástase (LIM, 2006).

Ainda não há consenso em relação a terapias adjuvantes. Em relação ao CEO, de modo geral, autores recomendam a radioterapia pós-operatória em casos onde há uma profundidade de invasão superior a 0,4cm com presença de margens positivas (TAN et al., 2012). A quimioterapia também pode ser realizada em casos de CEO que se apresentam em estágio avançado (KADEMANI et al., 2005).

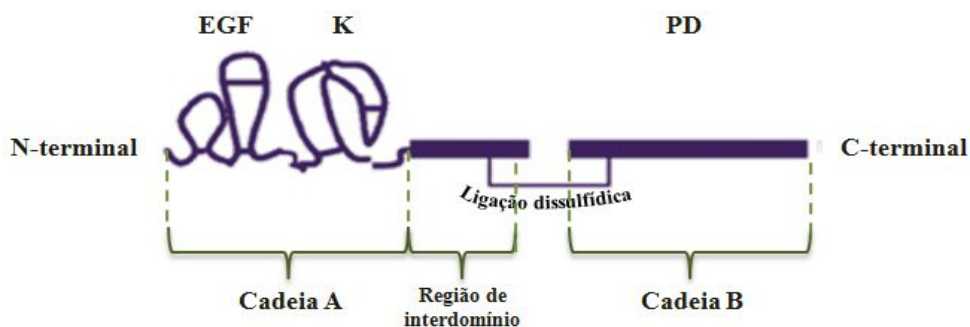
2.2 UPA e UPAR

2.2.1 Estrutura e Função

O uPA é uma serina protease de aproximadamente 50kDa que é sintetizado por células endoteliais, células musculares, células epiteliais, monócitos/macrófagos, fibroblastos e células tumorais de diferentes origens (STEPANOVA; TKACHUK, 2002; AISINA; MUKHAMETOVA, 2014). Ele é codificado pelo gene ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (PLAU), que fica localizado no locus cromossômico 10q24 e consiste em 11 éxons (ULISSE et al., 2009).

Estruturalmente, o uPA é composto por 411 aminoácidos e por duas cadeias (A e B) de polipeptídeos que são unidas por uma ligação dissulfídica. A cadeia A fica na porção N-terminal, e é composta por dois domínios: o domínio homólogo ao fator de crescimento epidérmico (domínio EGF; aminoácidos 1-49) e o domínio kringle (domínio K; aminoácidos 50-131). O domínio EGF é responsável pela interação entre esta molécula e o seu receptor, uPAR, e o domínio K interage com o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI) que é outro componente do PAS, que atua na regulação e inibição do uPA. A cadeia B contém o domínio das proteases (PD; aminoácidos 159-411) que é responsável pela ativação de serinas proteases como a plasmina. Ainda, entre a cadeia A e B, há uma região denominada interdomínio, composta pelos aminoácidos 132-158. (AISINA; MUKHAMETOVA, 2014; MEKKAWAY; POURGHOLAMI; MORRIS, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura do uPA.



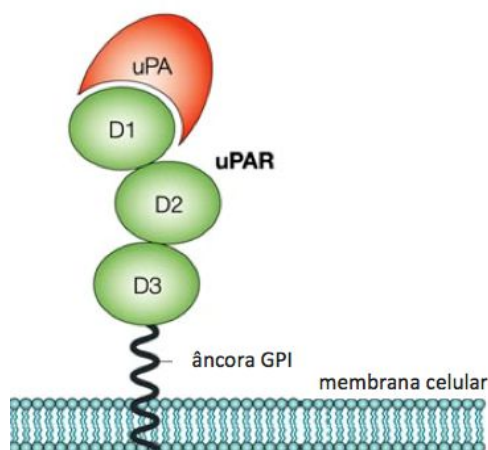
FONTE: Adaptado de Aisina; Mukhametova, 2014.

Assim como a maioria das serinas proteases, o uPA é liberado na sua forma de zimogênio, o pro-uPA. Este é composto por uma única cadeia polipeptídica que ao se ligar ao uPAR é convertido em uPA, pela ação de proteases sobre ele. Proteases estas que incluem a plasmina, catepsina-B e -L, tripsina e calicreína (SCHMITT et al., 1991). Estas atuam sobre o pro-uPA clivando-o entre os aminoácidos lisina158 (Lys158) e isoleucina159 (Ile159), formando as cadeias A e B, e convertendo-o em uPA. Este, uma vez formado, é 250x mais ativo do que o pro-uPA (MEKKAWAY; POURGHOLAMI; MORRIS, 2014).

O uPAR, também denominado de CD87, é codificado pelo gene receptor de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (PLAUR) que fica localizado no locus cromossômico 19q13 e é formado por 7 éxons (ULISSE et al., 2009). Ele é uma glicoproteína rica em cisteína, composto por 283 aminoácidos, e é um receptor específico do uPA (AISINA; MUKHAMETOVA, 2014). Ele é altamente versátil, participando de diversos processos como a migração celular, remodelação tecidual, cicatrização, inflamação, crescimento tumoral e invasão (DASS et al., 2008).

Estruturalmente, o uPAR é composto por uma única cadeia que se dobra em 3 domínios extracelulares (DI, DII e DIII). Ele não tem domínio transmembranar e fica aderido a membrana plasmática pela sua ligação com uma molécula de natureza lipídica denominada âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 2) (FOWLER et al., 1998).

Figura 2. Estrutura do uPAR



FONTE: Adaptado de Blasi e Carmeliet, 2002.

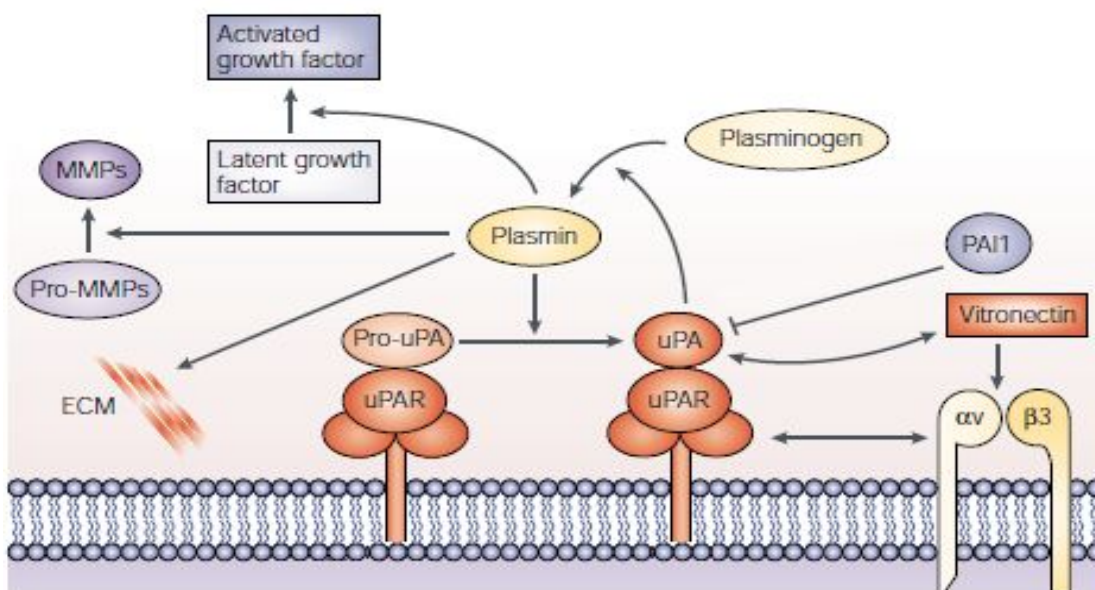
O uPAR é altamente susceptível à clivagem entre o DI e DII, de tal modo que quando há a interação uPA/uPAR, pode ocorrer a clivagem entre esses dois domínios causando a liberação do DI no meio extracelular, que passa a ser chamado de uPAR solúvel (suPAR-I), enquanto que o DII e DIII permanecem ligados à membrana plasmática pelo GPI. Por outro

lado, quando a enzima fosfolipase atua sobre o lipídio da proteína GPI, ocorre a clivagem do uPAR da membrana plasmática, liberando os três domínios que compõem o uPAR no meio extracelular [suPAR (I-III)], podendo ser detectados em exames de sangue e de urina (RONNE et al., 1995). Os suPARs estão moderadamente aumentados na inflamação e, intensamente aumentados, em diferentes tipos de cânceres, sendo correlacionados a um pior prognóstico (SORIO et al., 2011; KWAAN; MAZAR; MCHON, 2013).

Além de se ligar ao uPA, o uPAR é capaz de interagir com outras proteínas presentes na matriz extracelular, por meio de transdução de sinais, como com, por exemplo, as vitronectinas que são glicoproteínas ligantes da integrina $\alpha_v\beta_3$. Como o uPAR não tem um domínio transmembranoso e intracelular, acredita-se que ele consiga originar esses sinais de transdução por meio de interações laterais com proteínas transmembranares que incluem, membros da família das integrinas (WEI et al., 2001). Porém, esses sinais são somente originados quando o uPA está ligado ao uPAR. Esta capacidade de interagir com outras proteínas além do uPA, sugere que o uPAR seja uma estrutura flexível. Alguns autores afirmam que isto indicaria que o uPAR além de funcionar como um receptor de proteinase, também teria um papel na migração, adesão e proliferação celular (DASS et al., 2008; MEKKAWAY; POURGHOLAMI; MORRIS, 2014).

Já está bem estabelecida na literatura a capacidade da ligação uPA/uPAR contribuir para o crescimento tumoral, por meio da ativação da plasmina. Essas duas proteínas uma vez ligadas catalisam a conversão de plasminogênio em plasmina, por meio da clivagem dos aminoácidos arginina⁵⁶¹-valina⁵⁶² do plasminogênio (DASS et al., 2008). A plasmina, uma vez formada, tem a habilidade de degradar diretamente a laminina, colágeno, vitronectina, fibronectina e fibrinas e indiretamente, ativando outras enzimas proteolíticas como as MMPs, ocasionando a degradação da membrana basal e matriz extracelular (LIJNEN, 2001; DEL ZOPPO, 2010). Além disso, a plasmina está associada ao aumento nos níveis do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como uma consequência da destruição da matriz extracelular e, ainda, atua ativando diretamente o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) (ALFANO et al., 2005). Por conseguinte, o papel da plasmina se estende além da sua atividade proteolítica, atuando também na proliferação e diferenciação celular por meio da ativação de fatores de crescimento (Figura 3).

Figura 3. Representação da ligação uPA/uPAR.



FONTE: Adaptado de Rao, 2003.

Alguns estudos demonstram que além da interação uPA/uPAR atuar na ativação de plasmina, essas proteínas também estão vinculadas a outros fatores associados a carcinogênese, incluindo a proliferação celular e transição epitélio-mesênquima (TEM) (DUFFY; DUGGAN, 2004; GONDI et al. 2007; LESTER et al. 2007; JO et al. 2009; ULISSE et al., 2009; EDEN et al. 2011).

Em relação à proliferação celular, a associação uPA/uPAR parece estar relacionada a ativação de diversas vias de sinalização necessárias para manter a atividade mitogênica das células cancerígenas, incluindo a via da quinase de adesão focal (FAK), a da proteína tirosina quinase c-Src e a da quinase reguladora de sinalização extracelular/proteína quinase ativada por mitógeno (ERK/MAPK) (AGUIRRE GHISO; KOVALSKI; OSSOWSKI, 1999; MONAGHAN-BENSON; MCKEOWN-LONGO, 2006). Segundo Liu et al. (2002), o uPAR interage com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e com isso ativa a via ERK/MAPK, que desencadeia a proliferação celular e crescimento tumoral. Yebra et al. (1996) relataram que isso ocorre porque quando há interação entre o uPAR e os membros da família das integrinas, ocorre a ativação da via FAK e do EGFR. Ainda, em estudo realizado por Milanese et al. (2009) foi relatado que os níveis sorológicos de EGFR e uPAR se apresentam em níveis similares sugerindo uma correlação entre essas proteínas. Adicionalmente, uma pesquisa realizada por D'Alessio, Gerasi e Blasi (2008) foi observado

que em camundongos *knock-out* de uPAR, não ocorre a ativação da EGFR e suas vias de sinalização.

Um evento bem conhecido na carcinogênese é a TEM. Nela, as células sofrem modificação na sua polaridade e fenótipo e se transformam em células com alta motilidade e formato fusiforme. A TEM atua no desenvolvimento embrionário, na inflamação crônica, assim como, na invasão celular e metástase por meio de diversos mecanismos (HUBER; KRAUT; BEUG, 2005). Já foi reconhecido que a hipóxia atua na indução da TEM e, foi relatado que o uPAR induz a TEM em condições hipóxicas por meio da ativação de moléculas de diversas vias de sinalização incluindo o ERK, PI3K/Akt e Src (LESTER et al., 2007). Ainda, em um estudo *in vitro* em células tumorais do câncer de mama realizado por Jo et al. (2009) foi demonstrado que a TEM induzida pelo uPAR é reversível pela re-oxigenação, assim como, quando há a inibição do uPA ou das atividades do ERK, PI3K e Src.

2.2.2 Expressão uPA/uPAR no câncer

O primeiro estudo a associar o uPA ao câncer foi realizado em 1988 por Duffy et al. Nele foi documentado que, em carcinoma de mama primário, o uPA estava correlacionado positivamente com o tamanho do tumor e número de linfonodos comprometidos. Os autores ainda relataram que os altos níveis de uPA estão relacionados a um menor intervalo livre de doença, quando comparado a pacientes com menores níveis de uPA.

Desde então, estudos vêm apontando que o uPA e uPAR são superexpressos em uma variedade de tumores malignos, incluindo o câncer de mama (PIERGA et al., 2005; JELISAVAC-COSIC et al., 2011), pulmão (CHEN et al., 2011; LANGKILDE et al., 2011; LIU et al., 2011), bexiga (CASELLA et al., 2002; ECKE et al., 2005), estômago (KITA et al., 2009; ALPIZAR-ALPIZAR et al., 2010; LAERUM et al., 2012), colorretal (HERSZENYI et al., 2008; MINOO et al., 2010), endométrio (MEMARZADEH et al., 2002; SAMOUELIAN et al., 2008), ovário (DORN et al., 2011), tireóide (KIM et al., 2002; CHU et al., 2004) e renal (FUESSEL et al. 2014).

Del Vecchio et al. (1993) relataram que a concentração de uPA em carcinoma de mama é 19 vezes maior do que em tumores benignos. Kim et al. (2002) afirmaram que o uPAR é útil na discriminação entre o carcinoma de tireóide folicular e o adenoma folicular. Em carcinoma de estômago, Kita et al. (2009) relataram que a sobreexpressão do mRNA do uPAR no sangue poderia indicar metástase a distância, e outros estudos mais recentes evidenciaram

que o uPAR poderia servir para mensurar o potencial invasivo do adenocarcinoma gástrico (ALPIZAR-ALPIZAR et al., 2010; ALPIZAR-ALPIZAR et al., 2012).

A associação do uPA/uPAR com o prognóstico nesses tumores malignos, e ainda a realização de estudos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram que a inibição dessas proteínas acarretavam na diminuição do crescimento tumoral, chamou a atenção de pesquisadores que estudam tumores de cavidade oral.

Hundsorfer et al. (2004) avaliaram, pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a concentração de uPA em tecido tumoral e em mucosa oral normal em pacientes com CEO. Para ser realizada a análise, os tecidos foram congelados logo após a remoção cirúrgica. Os resultados mostraram uma concentração nove vezes maior do uPA nos casos dos tumores em relação ao tecido normal. Posteriormente, Baker et al. (2007) em estudo similar, avaliando as concentrações tanto de uPA como de uPAR, observaram resultados semelhantes, dentre os quais a média do uPA foi de 1,7 ng/mg no tumor e 0,1ng/mg em mucosa normal; e a média do uPAR no tumor foi de 1,6ng/mg e na mucosa normal de 0,2ng/mg, sugerindo que o uPA/uPAR pode ter um papel importante na carcinogênese oral.

Por outro lado, o estudo de Gershtein et al. (2010), também realizado a partir de material congelado, relatou que apesar de observarem um aumento do uPA no tecido tumoral em relação ao tecido de mucosa oral normal, não detectaram nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação à gradação histológica, presença/ausência de metástase, estadiamento clínico TNM e localização do tumor.

Em 2011, pela análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP), Weng et al. investigaram se polimorfismos do uPA e uPAR poderia causar uma alteração nas suas expressões e, com isso, influenciar a progressão do CEO. A amostra foi composta por 253 pacientes com CEO e 344 pacientes saudáveis. A análise estatística não encontrou correlação entre o polimorfismo de uPA e uPAR na suscetibilidade do CEO, porém, foi observado que polimorfismos em ambos os genes parecem ter um impacto na suscetibilidade de consumidores de betel ao CEO, enquanto que o uPA, isoladamente, parece ter uma relação na carcinogênese com consumidores de tabaco. Com isso, os autores concluíram que a combinação de polimorfismos de componentes do PAS do tipo uroquinase e agentes ambientais, parecem estar relacionadas ao risco de desenvolvimento do CEO.

Para analisar a função do uPAR, Nozaki et al. (2005) silenciaram o uPAR em uma linhagem celular de CEO e compararam com grupo controle. Eles relataram que no grupo silenciado foi observado histologicamente que as células estavam organizadas em grupos,

porém sem bordas distintas, enquanto que no grupo controle foi observado um padrão mais invasivo, com células dispostas difusamente e disseminadas. Com isso, os autores concluíram o papel do uPAR na invasão do CEO, assim como também sugeriram que o uPAR deveria ser considerado um alvo terapêutico em casos de CEO.

Nozaki et al. (1998) descreveram o primeiro estudo imuno-histoquímico que avaliou a expressão de uPA e uPAR no CEO e sua correlação com parâmetros clínico-patológicos. Embora não tenha observado associação com o tamanho do tumor e gradação histológica de malignidade, a análise observou que a maior expressão de uPA e uPAR estava associada ao pior padrão de invasão e especificamente o uPA estava associado a presença de metástase linfonodal secundária. Em estudo similar, Inoue et al. (2007) observaram associação entre o uPA e uPAR no CEO em relação ao pior padrão de invasão, presença de metástase linfonodal e maior tamanho do tumor. Adicionalmente, uma menor sobrevida foi relacionada a uma maior expressão do uPAR. Assim, ambos os trabalhos concluíram que os componentes do PAS do tipo uroquinase tem uma participação ativa nos processos de invasão e metástase do CEO, podendo ser uma ferramenta importante na avaliação do curso clínico desta neoplasia.

Magnussen et al. (2014) analisaram semiquantitativamente a expressão imuno-histoquímica de uPA e uPAR em casos de CEO de pacientes que não apresentaram metástase linfonodal no momento do diagnóstico. A marcação para ambas as proteínas foi predominantemente citoplasmática, embora também tenha sido observada marcação membranar. Quando comparado a expressão de ambos os marcadores à gradação histológica de malignidade e uso de fumo e tabaco, não foi encontrado associação, porém, foi observado que pacientes com estadiamento T1N0M0 no momento do diagnóstico, exibiram uma menor expressão do uPAR que foi estatisticamente associada a uma maior sobrevida de cinco anos. Com isso, os autores concluíram que o uPAR poderia ser um potencial biomarcador preditivo em tumores em estágios iniciais.

Em 2011, Yoshizawa et al. analisaram a expressão do uPA e uPAR em seis diferentes linhagens celulares de CEO por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e *Western blotting*. As linhagens celulares apresentavam diferentes modos de invasão, baseadas em um critério realizado, previamente, por Yamamoto, Miyakawa e Kohama (1984): as linhagens HSC-4 e OSC-20 não apresentavam membrana basal distinguível (padrão moderadamente invasivo); OSC-19 e OTC-04 apresentavam cordões e ninhos neoplásicos (padrão altamente invasivo); e HOC313 e TSU apresentavam invasão difusa e disseminada (pior padrão de invasão). Foi observado uma maior expressão do uPA e uPAR nas linhagens de pior padrão de invasão, quando comparados as linhagens de padrão moderadamente

invasivo. Adicionalmente, através da técnica de imuno-histoquímica, eles observaram que maior expressão de uPA e uPAR está associada a uma menor sobrevida. Diante disto, os autores sugerem que essas proteínas podem ser usadas como biomarcadores para avaliar o prognóstico do CEO.

Em 2006, Lindberg, Larsson e Nielsen descreveram o padrão de imunomarcção do uPAR em espécimes de CEO. Baseado no padrão de invasão proposto por Anneroth, Batsakis e Luna (1987), foi observado que os tumores com um padrão de invasão bem delimitado e presença de cordões neoplásicos somente na lâmina própria apresentavam positividade peritumoral em células estromais e inflamatórias (predominantemente macrófagos), enquanto que, os com presença de células malignas entre as fibras musculares e glândulas salivares ou distribuição difusa e disseminada, apresentavam positividade tanto em células neoplásicas como nas estromais e inflamatórias, especialmente na região de *front* de invasão. Posteriormente, um estudo retrospectivo realizado por Bacchiocchi et al. (2008) observaram o mesmo padrão de imunomarcção do uPAR no CEO, através da gradação histológica da OMS, exibindo maior expressão dessa proteína nos tumores pobremente diferenciados. Assim, os autores concluíram que o uPAR poderia contribuir para a disseminação e invasão das células neoplásicas, além de sugerirem seu papel como um potencial fator prognóstico.

Zhang et al. (2011) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de diversas enzimas proteolíticas, incluindo o uPA, e proteínas constituintes da membrana basal (colágeno e fibronectina), em 138 espécimes de pacientes com CELO, submetidos a ressecção cirúrgica. Foi relatado que a marcação de uPA foi predominantemente citoplasmática e em região de *front* de invasão. Embora não tenha sido encontrado correlação entre o uPA e a gradação histológica de malignidade, os resultados mostraram uma superexpressão do uPA em estágios clínicos mais avançados do CELO, obtendo uma associação estatisticamente significativa. Além disso, a expressão do uPA foi correlacionado negativamente com a da fibronectina, sugerindo uma interação entre essas moléculas. Assim, os autores concluíram que a superexpressão de uPA pode ser uma importante característica de progressão do CELO.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo objetiva avaliar a expressão imuno-histoquímica do uPA e uPAR em uma série de casos de CELO, correlacionando-a com os aspectos clínico-patológicos de metástase linfonodal regional, estadiamento clínico TNM, recidiva locorregional, desfecho da doença e gradação histológica de malignidade de Bryne (1998). Com os resultados desta investigação pretende-se obter novas informações inerentes ao comportamento biológico da lesão estudada, assim como a possível utilização de uPA e uPAR como marcadores da agressividade do tumor.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer (LNRCC), conforme parecer de número 1.170.634 (ANEXO A). Foi solicitado e aceito a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido para esta investigação (APÊNDICE A).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa consiste em um estudo descritivo e retrospectivo, caracterizado pela observação, análise e registro da expressão imuno-histoquímica de uPA e uPAR em casos de CELO.

4.3 POPULAÇÃO

A população foi constituída por todos os casos de CELO, diagnosticados e registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio, Natal-RN.

4.4 AMOSTRA

A amostra foi intencional, considerando que foram selecionados todos os casos de CELO, fixados em formol a 10% e emblocados em parafina obtidos a partir dos registros no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio, Natal-RN, no período de 2002 a 2010. Os dados clínicos de interesse para o estudo foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes, os quais permaneceram no referido serviço.

4.4.1 Critérios de inclusão da amostra

Nesta amostra, foram incluídos espécimes de CELO tratados por excisão cirúrgica, sem radioterapia ou quimioterapia prévia, com material biológico suficiente para a gradação histológica de malignidade e a avaliação imuno-histoquímica. Foram incluídos na pesquisa

somente os casos de tumores primários e com 5 anos de acompanhamento que apresentaram prontuários médicos adequadamente preenchidos, contendo os dados clínicos necessários ao estudo. Especificamente para a seleção dos casos com metástase linfonodal regional, deve ter havido a confirmação das metástases nos laudos anatomopatológicos emitidos pelo referido serviço.

4.4.2 Critérios de exclusão da amostra

Foram excluídos todos os casos de CELO que não se ajustaram às exigências dos critérios de inclusão.

4.5 ESTUDO CLÍNICO

As informações clínicas inerentes para a presente pesquisa tais como idade, sexo, estadiamento clínico TNM, presença/ausência de metástase linfonodal regional, presença/ausência de recidiva e desfecho foram obtidas a partir dos prontuários médicos dos pacientes portadores de CELO e transcritas em fichas previamente elaboradas (APÊNDICE B). Para a análise do estadiamento clínico, foram utilizados os parâmetros elencados na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), os quais são apresentados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CEO, preconizado por SOBIN, WITTEKIND (2002).

T – TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em seu diâmetro maior
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca ou pele da face (queixo ou nariz)
T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides, base do crânio ou artéria carótida interna
N – ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS REGIONAIS	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
	N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
	N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
M – METÁSTASE À DISTÂNCIA	
MX	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Quadro 2. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CEO, preconizado por SOBIN, WITTEKIND (2002).

ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO TNM		
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVb	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
IVc	Qualquer T	Qualquer N	M1

4.6 ESTUDO MORFOLÓGICO

Os espécimes teciduais dos casos selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos de 5 µm de espessura, estendidos em lâminas histológicas e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). A referida técnica seguiu o protocolo de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN.

Os cortes histológicos corados foram examinados em microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN), sob aumentos de 100x e 400x, para a análise da gradação histológica de malignidade no *front* de invasão tumoral, com base nos parâmetros definidos pelo sistema de gradação histológica de Bryne (1998) (Quadro 3).

Quadro 3. Sistema de gradação histológica de malignidade proposto por Bryne (1998).

Parâmetros Morfológicos	ESCORE DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Altamente ceratinizado (mais de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo Nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (mais de 75% de células maduras)	Moderado pleomorfismo nuclear (50 a 75% de células maduras)	Intenso pleomorfismo (25 a 50% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (0 a 25% das células maduras)
Padrão de Invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (N>15)	Dissociação celular difusa e pronunciada, em pequenos grupos e/ou células individuais (N<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Nesta forma de avaliação, foi atribuído um escore de 1 a 4 para cada critério morfológico analisado e, em seguida, foram somados os escores correspondentes a cada parâmetro, obtendo-se os escores finais de malignidade. Os casos com escores finais compreendidos entre 4 e 8 foram classificados como de *baixo grau de malignidade*, e aqueles com escore igual ou superior a 9, classificados como de *alto grau de malignidade*, de acordo com a metodologia do estudo de Silveira et al. (2007).

Ressalta-se que a gradação histológica foi realizada por dois examinadores previamente treinados, sem que os mesmos tivessem conhecimento das informações clínicas dos casos estudados. Nos casos em que as gradações histológicas determinadas pelos examinadores foram discordantes, as lâminas foram reexaminadas pelos avaliadores em conjunto, de forma a se obter um resultado consensual. Os dados referentes à gradação histológica de malignidade foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE C).

4.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.7.1 Método imuno-histoquímico

Todos os espécimes teciduais selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos de 3 μ m de espessura e estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxisilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Em seguida, foram submetidos ao método da imunoperoxidase, com a utilização do anticorpo monoclonal anti-uPAR e do anticorpo policlonal anti-uPA (Quadro 4).

Como controle positivo das reações imuno-histoquímicas, utilizou-se espécimes do próprio tecido tumoral estudado. Por sua vez, o controle negativo consistiu na substituição dos anticorpos primários por albumina de soro bovino (BSA) a 1%, em solução tampão.

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito a seguir:

- Desparafinização, reidratação e recuperação antigênica em solução de *Trilogy* (Cell Marque, CA, USA), na concentração de 1:100, em panela Pascal, por 30 minutos;
- Bloqueio da peroxidase endógena tecidual em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes), por 15 minutos, à temperatura ambiente (TA);
- Lavagem em água corrente (5 minutos);
- Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- Duas passagens em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl (tris-hidroximetilaminometano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7,4 (5 minutos cada);
- Bloqueio das ligações inespecíficas em solução de proteína *Block* (Thermo Scientific, Runcorn, UK) por 5 minutos, TA;
- Duas passagens em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação dos cortes com os anticorpos primários (Quadro 4);
- Duas passagens em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com o reagente amplificador do sistema de detecção Hidef (HRP, *Polymer System*) por 15 minutos, TA;
- Duas passagens em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com o polímero HRP do sistema de detecção Hidef (HRP, *Polymer System*) por 15 minutos, TA;
- Duas passagens em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

- Revelação da reação com a solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB + Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) em câmara escura, por 5 minutos, TA;
- Lavagem em água corrente (5 minutos);
- Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- Contracoloração com hematoxilina de Harris (5 minutos), TA;
- Lavagem em água corrente (5 minutos);
- Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80° GL (2 minutos), TA;
 - Álcool etílico 95° GL (2 minutos), TA;
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos), TA;
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos), TA;
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos), TA;
- Diafanização em três banhos de xilol (2 minutos cada);
- Montagem em resina *Permout®* (Erviagas, São Paulo, SP, Brasil).

Quadro 4. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Tempo de Incubação
uPA	H-140	Santa Cruz Biotechnonology	1:500	Trilogy, 1:100 Pascal, 30 min	<i>Overnight</i> 4° C
uPAR	E-3	Santa Cruz Biotechnonology	1:500	Trilogy, 1:100 Pascal, 30 min	<i>Overnight</i> 4° C

4.7.2 Análise do perfil imuno-histoquímico

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imuno-histoquímico, cada espécime foi analisado à microscopia de luz (*Olympus CX31, Tokyo, Japan*), por um examinador, previamente treinado, em dois momentos distintos, sem que este tivesse conhecimento prévio das informações clínicas dos casos estudados. As células tumorais foram consideradas positivas, para os dois anticorpos, quando apresentaram coloração acastanhada na membrana e/ou citoplasma.

As análises dos marcadores uPA e uPAR foram realizadas de forma semiquantitativa ao longo do *front* de invasão e do centro do tumor, sob o aumento microscópico de 40x (Olympus CX31, Tokyo, Japan). Foram atribuídos a ambos os marcadores escores levando-se em consideração uma adaptação da metodologia estabelecida por Magnussen et al. (2014): 0= ausência de marcação; 1 = 1% - 10%; 2 = 11% - 50%; e 3= maior que 50%. Os dados obtidos com essa avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE D).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos foram digitados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago IL, USA). Assumindo a não normalidade da amostra, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os escores de imunopositividade para uPA e uPAR e as variáveis clínico-patológicas. Adicionalmente, para analisar a expressão dos marcadores em relação aos parâmetros morfológicos da gradação histológica de Bryne (1998) foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

Para analisar diferenças estatísticas entre os marcadores no *front* de invasão e centro do tumor foi realizado o teste de Wilcoxon. Por fim, o teste de correlação de Spearman foi realizado para avaliar as possíveis correlações entre os marcadores, no *front* de invasão e centro do tumor.

Adicionalmente, com o objetivo de avaliar a variabilidade de concordância entre os observadores em relação à gradação histológica de malignidade, foi calculado o coeficiente ponderado de Kappa que denotou uma concordância regular (Kappa=0,467; $p=0,037$). Para todos os testes estatísticos, foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra deste estudo foi constituída por 46 casos de CELO, dos quais 26 (56,5%) apresentaram metástase linfonodal e os 20 (43,5%) restantes com ausência de metástase linfonodal. Constatou-se um predomínio do sexo masculino (65,2%) e a 7ª década de vida mostrou maior prevalência, com média de idade de 62,8 anos de idade.

De acordo com o estadiamento clínico TNM, houve uma maior ocorrência do estágio III (n=21; 45,6%), seguido dos estágios IV (n=11; 23,9%), II (n=9; 19,6%) e I (n=5; 10,9%). Ao realizar a categorização do estadiamento clínico em dois grupos, observou-se uma preponderância dos estágios III e IV (n=32; 69,6%) em relação aos estágios I e II (n=14; 30,4%).

Do total da amostra, foram observados 14 casos (30,4%) de recidiva. Para análise de desfecho, foram apenas selecionados os casos de óbito e remissão da doença, de tal modo que três casos foram excluídos por terem sido categorizados como doença em progressão. Dos 43 restantes, o desfecho de óbito foi o mais prevalente (n=24; 55,8%) em relação ao de remissão (n=19; 44,2%).

5.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Dos 46 casos de CELO avaliados pela gradação histológica de malignidade de Bryne (1998), a maioria foi classificada como de alto grau de malignidade (n=39; 84,8%) (Figura 4) em relação aos de baixo grau de malignidade (n=7; 15,2%) (Figura 5). No que se refere aos parâmetros morfológicos, a maioria dos casos foi classificada como altamente ceratinizado (n=23; 50%), moderado pleomorfismo (n=22; 47,8%), dissociação celular (n=15) (n=37; 80,4%) e moderado infiltrado inflamatório (n=26; 56,5%) (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil morfológico dos 46 casos de CELO. Natal-RN, 2016

Parâmetros	n	%
Gradação de Bryne		
Baixo grau	7	15,2
Alto grau	39	84,8
Grau de ceratinização		
Altamente ceratinizado	23	50
Moderadamente ceratinizado	6	13
Mínima ceratinização	8	17,4
Nenhuma ceratinização	9	19,6
Pleomorfismo nuclear		
Pouco pleomorfismo	7	15,2
Moderado pleomorfismo	22	47,8
Intenso pleomorfismo	14	30,4
Pleomorfismo extremo	3	6,5
Padrão de invasão		
Bordas infiltrativas bem delimitadas	0	0
Bandas e/ou trabéculas sólidas	4	8,7
Pequenos grupos ou cordões (n>15)	5	10,9
Dissociação celular (n<15)	37	80,4
Infiltrado inflamatório		
Intenso	14	30,4
Moderado	26	56,5
Escasso	5	10,9
Ausente	1	2,2

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Figura 4. Fotomicrografia demonstrando os aspectos morfológicos do CELO de alto grau de malignidade (H/E; Barra=200 μ m).

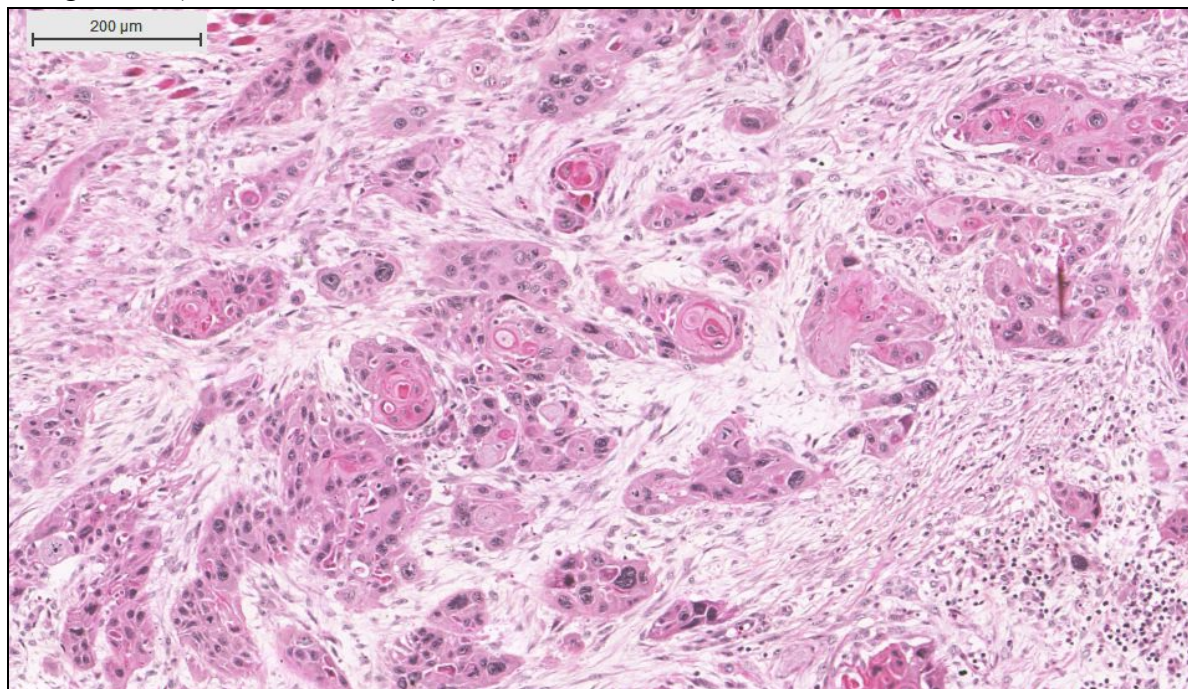
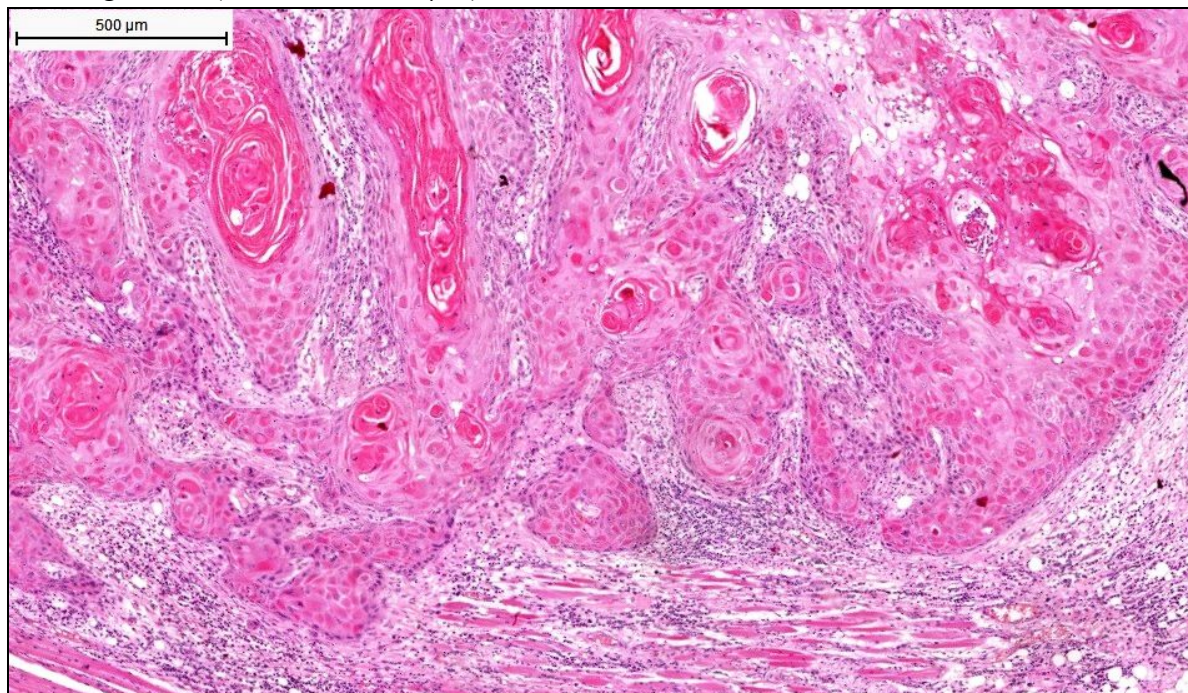


Figura 5. Fotomicrografia demonstrando os aspectos morfológicos do CELO de baixo grau de malignidade (H/E; Barra=500 μ m).



5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

5.3.1 Análise da imunexpressão de uPA

A expressão imuno-histoquímica do uPA foi observada nas células epiteliais de 43 casos (93,5%) no *front* de invasão, e em 31 casos (67,4%) no centro do tumor. Adicionalmente, observou-se imunorreatividade desta proteína em fibroblastos, células endoteliais, e macrófagos (Figura 6 e 7).

A análise da imunexpressão no *front* do tumor revelou que 16 casos (34,8%) foram classificados como escore 2, seguido de 15 casos (32,6%) como escore 1 e 12 casos (26,1%) como escore 3. Em três casos (6,5%) não houve marcação. Por outro lado, no centro do tumor a maioria dos casos foram classificados como escore 1 (n=15; 32,6%) e escore 0 (n=15; 32,6%), seguido dos escores 2 (n=9; 19,6%) e 3 (n=7; 15,2%).

Em relação à metástase linfonodal, a análise da expressão de uPA no *front* de invasão revelou, nos casos sem metástase, distribuição relativamente similar entre os escores 1 (n=8; 40%), 2 (n=6; 30%) e 3 (n=6; 30%). No grupo com metástase, a maioria dos casos foi escore 2 (n=10; 38,5%), seguido dos escores 1 (n=7; 26,9%) e 3 (n=6; 23,1%). Três casos (11,5%) não apresentaram marcação. No centro do tumor, nos casos sem metástase, foi observado uma distribuição relativamente similar entre os escores 0 (n=6; 30%), 1 (n=5; 25%), 2 (n=5; 25%) e 3 (n=4; 20%). No grupo com metástase, a maior parte dos casos foi escore 1 (n=10; 38,5%), seguido dos escores 0 (n=9; 34,6%), 2 (n=4; 15,4%) e 3 (n=3; 11,5%). O teste de Mann-Whitney, revelou não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem metástase e a imunexpressão de uPA tanto do *front* de invasão ($p=0,36$), como no centro do tumor ($p=0,64$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPA no *front* de invasão e no centro do tumor em relação à metástase linfonodal. Natal, RN - 2016.

Localização/ Metástase	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	p
Front de invasão						
Ausente	20	2,00	1,00-3,00	24,50	220,00	0,36
Presente	26	2,00	1,00-2,25	22,73		
Centro do tumor						
Ausente	20	1,00	0,00-2,00	25,50	240,00	0,64
Presente	26	1,00	0,00-2,00	21,96		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Em relação ao estadiamento clínico TNM, a avaliação no *front* de invasão revelou que a maioria dos casos, para os carcinomas nos estágios I e II, foi escore 1 (n=6; 42,8%), seguido dos escores 2 (n=4; 28,6%) e 3 (n=4; 28,6%). Nos estágios III e IV foi constatado maior marcação do escore 2 (n=12; 37,5%), seguido dos escores 1 (n=9; 28,1%), 3 (n=8; 25%) e 0 (n=3; 9,4%). No centro do tumor, a maioria dos casos, para carcinomas nos estágios I e II, foi escore 0 (n=6; 42,9%), seguido dos escores 2 (n=3; 21,4%) e 3 (n=3; 21,4%) e 1 (n=2; 14,3%). Para as lesões estágios III e IV, a maioria expressou escore 1 (n=13; 40,6%), seguido dos escores 0 (n=9; 28,1%), 2 (n=6; 18,8%) e 3 (n=4; 12,5%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPA entre os casos de estadiamento clínico I/II e III/IV no *front* de invasão ($p=0,90$) e centro do tumor ($p=0,98$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPA no *front* de invasão e no centro do tumor em relação ao estadiamento clínico TNM. Natal, RN - 2016.

Localização/ Estadiamento	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	p
Front de invasão						
Estágio I e II	14	2,00	1,00-2,25	23,86	219,00	0,90
Estágio III e IV	32	2,00	1,00-2,00	23,34		
Centro do tumor						
Estágio I e II	14	1,00	0,00-3,00	23,43	223,00	0,98
Estágio III e IV	32	1,00	0,00-2,75	23,53		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

A avaliação no *front* de invasão, para os casos sem recidiva, constatou que a maioria dos casos exibiu escore 2 (n=10; 31,3%) e 3 (n=10; 31,3%), seguido dos escores 1 (n=9; 28,1%) e escore 0 (n=3; 9,3%). Todos os casos evidenciaram marcação para os casos com recidiva com predominância dos escores 1 (n=6; 42,9%) e 2 (n=6; 42,9%), seguido dos escores 3 (n=2; 14,3%). No centro do tumor, nos casos sem recidiva, foi observado uma distribuição relativamente similar entre os escores 0 (n=10; 31,3%), 1 (n=9; 28,1%), 3 (n=7; 21,9%) e 2 (n=6; 18,7%). A maioria dos casos com recidiva foi escore 1 (n=6; 42,9%), seguido dos escores 0 (n=5; 35,7%) e 2 (n=3; 21,4%). Nenhum caso expressou escore 3. O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPA entre lesões com e sem recidiva no *front* de invasão ($p=0,56$) e centro do tumor ($p=0,25$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a imunopositividade para uPA no *front* de invasão e no centro do tumor em relação à recidiva. Natal, RN - 2016.

Localização/ Recidiva	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	P
Front de invasão						
Ausente	32	2,00	0,00-3,00	24,22	201,00	0,56
Presente	14	2,00	1,00-2,00	21,86		
Centro do tumor						
Ausente	32	1,00	0,00-2,00	24,94	178,00	0,25
Presente	14	1,00	0,00-1,25	20,21		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Em relação ao desfecho, a análise do *front* de invasão revelou, para os casos com remissão, 7 casos (36,8%) exibiram escore 2, 6 casos (31,6%) com escore 1, 5 casos (26,3%) com escore 3 e apenas 1 caso (26,3%) como escore 0. Nos casos com óbito houve também uma predominância do escore 2 (n=9; 37,5%), seguido dos escores 1 (n=7; 29,2%), 3 (n=6; 25%) e 0 (n=2; 8,3%). No centro do tumor, para os casos com remissão, a maior dos casos foram escore 0 (n=6; 31,6%) e 1 (n=6; 31,6%), seguido dos escores 2 (n=4; 21%) e 3 (n=3; 15,8%). Nos casos de óbito, a maioria dos casos foi escore 1 (n=9; 37,5%), seguido dos escores 0 (n=7; 29,1%), 2 (n=4; 16,7%) e 3 (n=4; 16,7%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPA entre os casos com óbito do paciente ou remissão da doença no *front* de invasão (*p*=0,89) e centro do tumor (1,00) (Tabela 5).

Tabela 5 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a imunopositividade para uPA no *front* de invasão e no centro do tumor em relação ao desfecho. Natal, RN - 2016.

Localização/ Desfecho	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	P
Front de invasão						
Remissão	19	2,00	1,00-3,00	22,29	222,50	0,89
Óbito	24	2,00	1,00-2,75	21,77		
Centro do tumor						
Remissão	19	1,00	0,00-2,00	22,00	228,00	1,00
Óbito	24	1,00	0,00-2,00	22,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Levando-se em consideração a gradação histológica de malignidade de Bryne (1998), os tumores de alto grau exibiram a maioria escore 2 (n=15; 38,5%), seguido dos escores 1 (n=12; 30,8%), 3 (n=11; 28,2%) e 0 (n=1; 2,5%). Nos tumores de baixo grau foi constatado uma distribuição relativamente similar entre os escores 1 (n=3; 42,9%), 0 (n=2; 28,5%), 2 (n=1; 14,3%) e 3 (n=1; 14,3%). No centro do tumor, os tumores de alto grau exibiram a maioria escore 0 (n=12; 30,8%) e 1 (n=12; 30,8%), seguido dos escores 2 (n=9; 25%) e 3 (n=6; 15,4%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou existir, no *front* de invasão, uma maior expressão de uPA nos casos de alto grau de malignidade em relação aos de baixo grau de malignidade ($p=0,05$). No centro do tumor não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,36$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPA no *front* de invasão e no centro do tumor em relação à gradação histológica de malignidade de Bryne (1998). Natal, RN - 2016.

Localização/ Gradação	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	p
Front de invasão						
Baixo grau	7	1,00	0,00-2,00	14,86	76,00	0,05
Alto grau	39	2,00	1,00-3,00	25,05		
Centro do tumor						
Baixo grau	7	1,00	0,00-1,00	19,43	108,00	0,36
Alto grau	39	1,00	0,00-2,00	24,23		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN

Em relação aos parâmetros morfológicos propostos por Bryne (1998), o teste de Kruskal-Wallis revelou existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPA entre os padrões de invasão, no qual foi observado uma maior expressão no padrão de invasão de dissociação celular (n<15) em relação ao padrão de bandas e/ou trabéculas sólidas e pequenos grupos ou cordões (n>15) ($p=0,03$). Em relação ao grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório, não foram observados resultados estatisticamente significativos (Tabela 7).

Tabela 7 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos e significância estatística (*p*) para a imunopositividade para uPA no *front* de invasão em relação aos parâmetros morfológicos da gradação histológica de malignidade de Bryne (1998). Natal, RN - 2016.

Parâmetros morfológicos	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	p
Grau de ceratinização					
Altamente ceratinizado	23	2,00	1,00-2,00	20,96	0,20
Moderadamente ceratinizado	6	2,00	1,00-3,00	26,00	
Mínima ceratinização	8	2,50	2,00-3,00	31,56	
Nenhuma ceratinização	9	2,00	1,00-2,00	18,22	
Pleomorfismo nuclear					
Pouco pleomorfismo	7	1,00	1,00-1,00	15,21	0,32
Moderado pleomorfismo	22	2,00	1,00-3,00	25,20	
Intenso pleomorfismo	14	2,00	1,00-2,25	24,43	
Pleomorfismo extremo	3	2,00	1,00-2,00	26,00	
Padrão de invasão					
Bandas e/ou trabéculas sólidas	4	1,00	0,00-1,50	10,50	0,03
Pequenos grupos ou cordões (n>15)	5	1,00	1,00-2,50	18,38	
Dissociação celular (n<15)	37	2,00	1,00-3,00	25,81	
Infiltrado inflamatório					
Intenso	14	2,00	1,00-2,00	21,21	0,36
Moderado	26	2,00	1,00-3,00	23,02	
Escasso	5	2,00	1,50-3,00	29,00	
Ausente	1	*	*	*	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN

*Não foi possível observar esse parâmetro.

Figura 6. Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPA no *front* de invasão e centro do tumor em CELO (Hiddef; Barra=200 μ m).

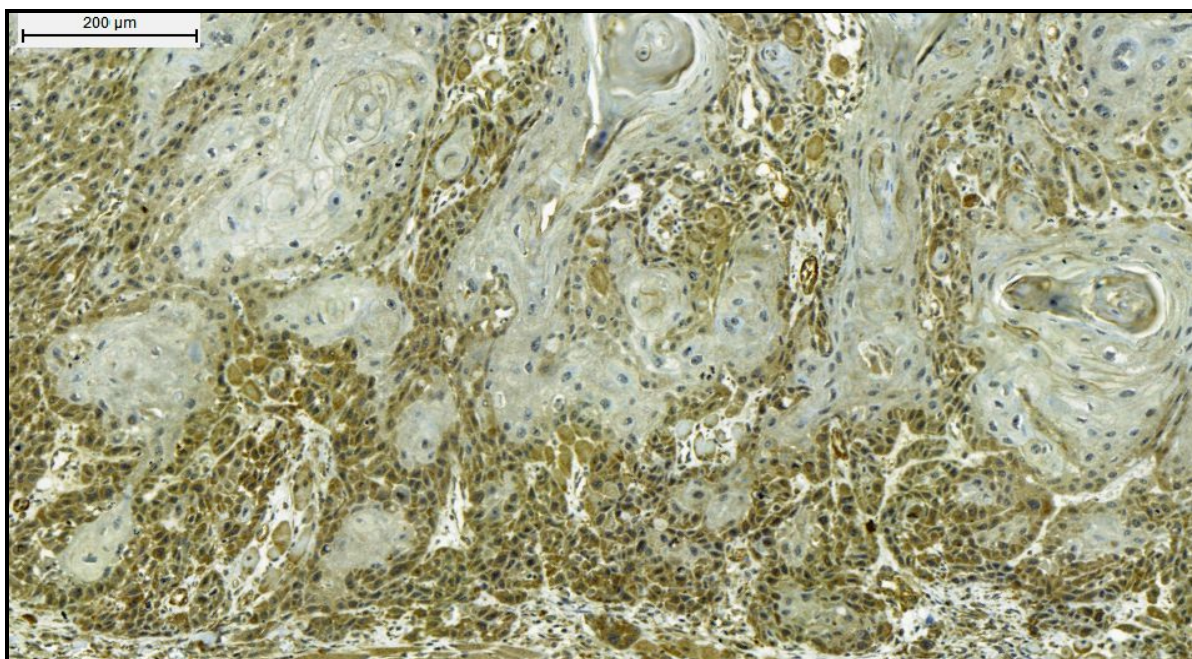
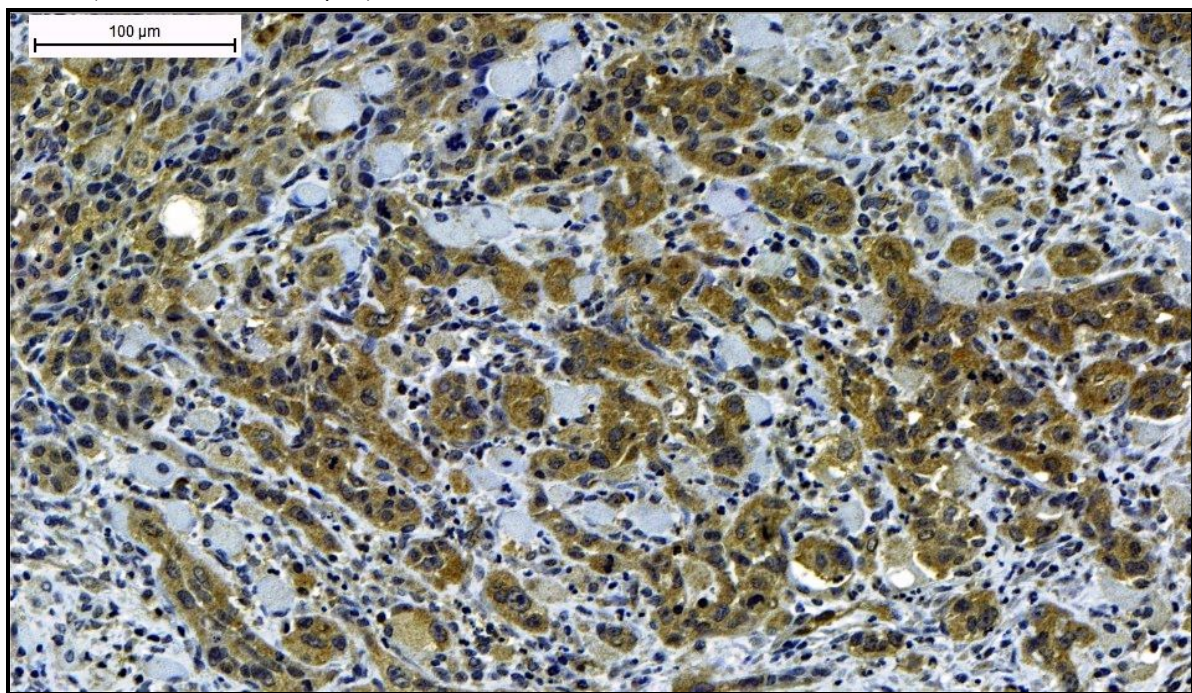


Figura 7. Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPA no *front* de invasão em CELO (Hiddef; Barra=200 μ m).



5.3.2 Análise da imunoe expressão de uPAR

A expressão do uPAR foi observada nas células epiteliais de 34 casos (73,9%) analisados no *front* de invasão, e em 21 casos (47,5%) no centro do tumor. Adicionalmente, observou-se imunorreatividade desta proteína em fibroblastos, células endoteliais e macrófagos (Figura 8 e 9).

A análise da imunoe expressão no *front* do tumor revelou que a maioria dos casos foi classificado como escore 1 (n=21; 45,6%), seguido dos escores 0 (n=12; 26,1%), 2 (n=8, 17,4%) e 3 (n=5; 10,9%). Na análise do centro do tumor foi observado que a maioria dos casos apresentou escore 0 (n=25; 54,4%), seguido dos escores 1 (n=18; 39,1%) e 2 (n=3; 6,5%). Nenhum caso no centro do tumor apresentou escore 3.

Em relação à metástase linfonodal, a expressão de uPAR no *front* de invasão revelou, para o grupo sem metástase, que a maioria dos casos foi escore 1 (n=11; 42,3%), seguido dos escores 0 (n=8; 30,8%), 3 (n=4; 15,4%) e 2 (n=3; 11,5%). Para o grupo com metástase, a maioria dos casos foi escore 1 (n=10; 50%), seguido dos escores 2 (n=7; 35%), 0 (n=6; 30%) e 3 (n=3; 15%). No centro do tumor, a maioria dos casos sem metástase linfonodal foi escore 0 (n=12; 60%), seguido dos escores 1 (n=7; 35%) e 2 (n=1; 5%). Nos casos com metástase houve o predomínio do escore 0 (n=13; 50%), seguido dos escores 1 (n=11; 42,3%) e 2 (n=2; 7,7%). O teste de Mann-Whitney, revelou não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem metástase e a imunoe expressão de uPAR tanto do *front* de invasão ($p=0,68$), como no centro do tumor ($p=0,49$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPAR no *front* de invasão e no centro do tumor em relação a metástase linfonodal. Natal, RN - 2016.

Localização/ Metástase	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	P
Front de invasão						
Ausente	20	1,00	1,00-2,00	24,38	242,00	0,68
Presente	26	1,00	0,00-2,00	22,83		
Centro do tumor						
Ausente	20	0,00	0,00-1,00	22,13	232,50	0,49
Presente	26	0,50	0,00-1,00	24,56		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Em relação ao estadiamento clínico TNM, a avaliação no *front* de invasão constatou que a maioria dos casos, para os carcinomas nos estágios I e II, foi escore 1 (n=7; 50%), seguido dos escores 2 (n=4; 28,6%), 0 (n=2; 14,3%) e 3 (n=1; 7,1%). Nos estágios III e IV foi constatado maior marcação também do escore 1 (n=14; 43,8%), seguido dos escores 0 (n=10; 31,2%) e escore 2 (n=4; 12,5%) e 3 (n=4; 12,5%). No centro do tumor, a maioria dos casos, para os carcinomas nos estágios I e II, foi escore 0 (n=7; 50%), seguido dos escores 1 (n=6; 42,9%) e 2 (n=1; 7,1%). Nos estágios III e IV foi constatado maior marcação no escore 0 (n=18; 56,2%), seguido dos escores 1 (n=12; 37,5%) e 2 (n=2; 6,3%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPAR entre os casos de estadiamento clínico I/II e III/IV no *front* de invasão ($p=0,32$) e centro do tumor ($p=0,70$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPAR no *front* de invasão e no centro do tumor em relação ao estadiamento clínico TNM. Natal, RN - 2016.

Localização/ Estadiamento	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	p
Front de invasão						
Estágio I e II	14	1,00	0,00-2,00	26,29	185,00	0,32
Estágio III e IV	32	1,00	0,00-1,75	22,28		
Centro do tumor						
Estágio I e II	14	0,50	1,00-1,00	24,50	210,00	0,70
Estágio III e IV	32	0,00	0,00-1,00	23,06		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

A avaliação no *front* de invasão, para os casos sem recidiva, constatou que a maioria dos casos exibiram escore 1 (n=16; 50%), seguido dos escores 0 (n=10; 31,3%), 2 (n=4; 12,5%) e 3 (n=2; 6,3%). Para os casos com recidiva foi observado um predomínio do escore 1 (n=5; 28,6%), seguido dos escores 2 (n=4; 28,6%), escore 3 (n=3; 21,4%) e 0 (n=2; 14,3%). No centro do tumor, a maioria dos casos sem recidiva exibiram escore 0 (n=19; 59,4%), seguido dos escores 1 (n=12; 37,5%) e 2 (n=1; 3,1%). Nos casos com recidiva foi observado um predomínio do escore 0 (n=6; 42,9%) e 1 (n=6; 42,9%), seguido dos escores 2 (n=2; 14,2%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou existir, no *front* de invasão, uma maior expressão de uPAR nos casos com recidiva em relação aos sem recidiva ($p=0,04$). No que se refere ao centro do tumor, não foi obtido resultado estatisticamente significativo ($p=0,21$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a imunopositividade para uPAR no *front* de invasão e no centro do tumor em relação à recidiva. Natal, RN - 2016.

Localização/ Recidiva	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	<i>p</i>
Front de invasão						
Ausente	32	1,00	0,00-1,00	20,97	143,00	0,04
Presente	14	1,50	1,00-2,00	29,29		
Centro do tumor						
Ausente	32	0,00	0,00-1,00	22,06	178,00	0,21
Presente	14	1,00	1,00-2,25	26,79		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Em relação ao desfecho, a análise do *front* de invasão revelou, para os casos com remissão, um predomínio do escore 1 (n=11; 57,89%), seguido dos escores 0 (n=8; 26,32%), 2 (n=2; 10,53%) e 3 (n=1; 5,26%). Nos casos com óbito foi observada um predomínio do escore 1 (n=10; 41,67%), seguido dos escores 0 (n=6; 25%), 2 (n=5; 20,83%) e 3 (n=3; 12,50%). No centro do tumor, para os casos com remissão houve um predomínio do escore 0 (n=13; 68,42%), seguido dos escores 1 (n=5; 25,32%) e 2 (n=1; 5,26%). Para os casos de óbito, a maioria expressou escore 1 (n=12; 50%), seguido dos escores 0 (n=11; 45,83%) e 2 (n=1; 4,17%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPAR entre os casos com óbito do paciente ou remissão da doença no *front* de invasão (*p*=0,39) e centro do tumor (*p*=0,18) (Tabela 11).

Tabela 11 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a imunopositividade para uPAR no *front* de invasão e no centro do tumor em relação ao desfecho. Natal, RN - 2016.

Localização/ Desfecho	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	<i>p</i>
Front de invasão						
Remissão	19	1,00	0,00-1,00	20,29	195,50	0,39
Óbito	24	1,00	0,00-2,00	23,35		
Centro do tumor						
Remissão	19	0,00	0,00-1,00	19,47	180,00	0,18
Óbito	24	1,00	0,00-1,00	24,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Levando-se em consideração a gradação histológica de malignidade de Bryne (1998), os de alto grau exibiram a maioria escore 1 (n=17; 43,59%), seguido dos escores 0 (n=10; 25,64%), 2 (n=7; 17,95%) e 3 (n=5; 12,82%). Nos tumores de baixo grau a maioria exibiu escore 1 (n=4; 57,14%), seguido dos escores 0 (n= 2; 28,57%) e 2 (n=1; 14,29%). Nenhum caso expressão escore 3. No centro do tumor, os tumores de alto grau exibiram a maioria escore 0 (n=21; 53,85%), seguido dos escores 1 (n=15; 38,46%) e 2 (n=3; 7,69%). Nos tumores de baixo grau a maioria foi escore 0 (n=4; 57,14%), seguido do escore 1 (n=3; 42,86%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPAR entre os casos de baixo e alto grau no *front* de invasão ($p=0,47$) e centro do tumor ($p=0,76$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística U e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPAR no *front* de invasão e no centro do tumor em relação a gradação histológica de Bryne. Natal, RN - 2016.

Localização/ Gradação	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	<i>p</i>
Front de invasão						
Baixo grau	7	1,00	0,00-1,00	20,36	114,50	0,47
Alto grau	39	1,00	0,00-2,00	24,06		
Centro do tumor						
Baixo grau	7	0,00	0,00-1,00	22,21	127,50	0,76
Alto grau	39	0,00	0,00-1,00	23,73		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN

Em relação aos parâmetros morfológicos propostos por Bryne (1998), o teste de Kruskal-Wallis revelou não existir diferença estatisticamente significativa no que se refere aos escores de marcação para uPAR e o grau de ceratinização, pleomorfismo celular, padrão de invasão e infiltrado inflamatório (Tabela 13).

Tabela 13 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos e significância estatística (*p*) para a imunopositividade para uPAR no *front* de invasão em relação ao padrão de invasão da gradação histológica de malignidade de Bryne (1998). Natal, RN - 2016.

Parâmetros morfológicos	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>p</i>
Grau de ceratinização					
Altamente ceratinizado	23	1,00	0,00-2,00	22,33	0,90
Moderadamente ceratinizado	6	1,00	0,75-1,50	23,75	
Mínima ceratinização	8	1,00	0,00-2,75	23,88	
Nenhuma ceratinização	9	1,25	1,00-2,00	26,00	
Pleomorfismo nuclear					
Pouco pleomorfismo	7	1,00	0,00-1,00	18,29	0,47
Moderado pleomorfismo	22	1,00	0,00-2,00	22,59	
Intenso pleomorfismo	14	1,00	0,75-2,00	26,61	
Pleomorfismo extremo	3	1,00	1,00-1,00	27,83	
Padrão de invasão					
Bandas e/ou trabéculas sólidas	4	0,50	0,00-1,00	14,75	0,22
Pequenos grupos ou cordões (n>15)	5	1,00	0,00-2,00	20,60	
Dissociação celular (n<15)	37	1,00	1,00-2,00	24,84	
Infiltrado inflamatório					
Intenso	14	1,00	1,00-2,00	26,75	0,44
Moderado	26	1,00	0,00-2,00	23,21	
Escasso	5	0,00	0,00-1,50	16,00	
Ausente	1	*	*	*	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN

*Não foi possível observar esse parâmetro.

Figura 8. Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPAR no *front* de invasão e centro do tumor em CELO (Hiddef; Barra=500 μ m).

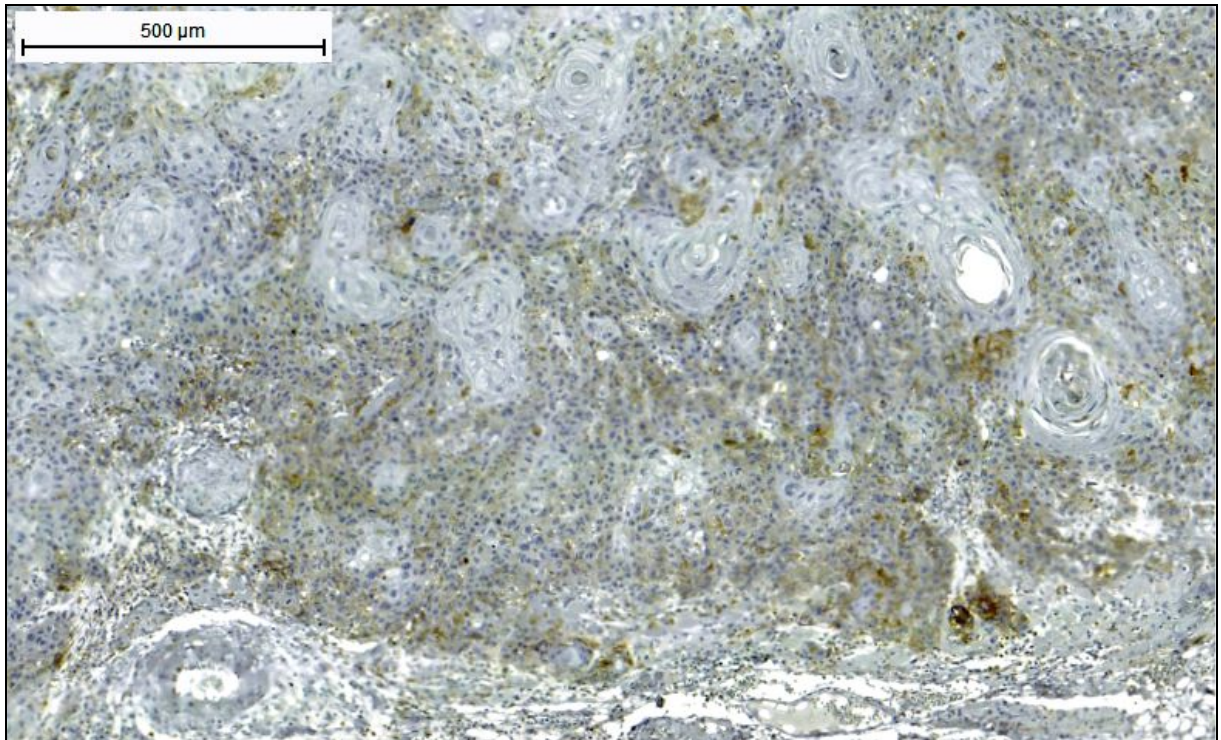
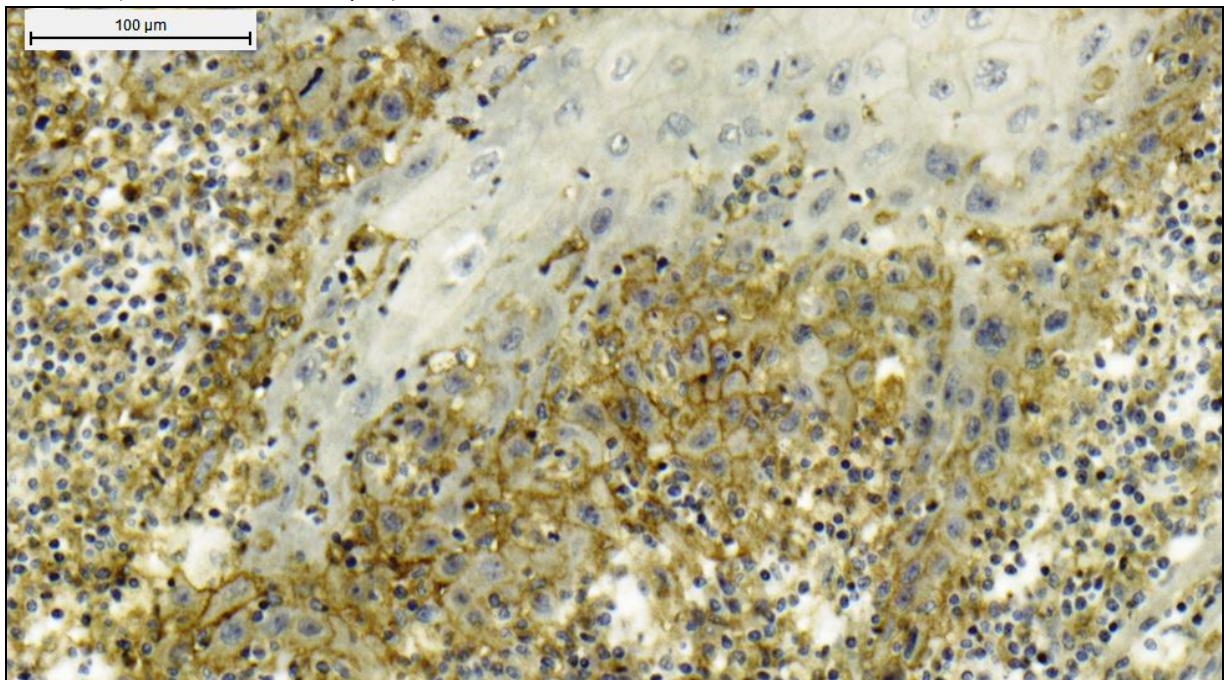


Figura 9. Fotomicrografia demonstrando imunoexpressão do uPAR em CELO no *front* de invasão (Hiddef; Barra=100 μ m).



5.3.3 Avaliação entre a imunoexpressão dos marcadores em relação à localização

Foram avaliadas a existência de diferenças significativas entre as imunoexpressões do uPA e uPAR no *front* de invasão e centro do tumor. O teste de Wilcoxon revelou uma maior expressão de uPA no *front* de invasão em relação ao centro do tumor, estatisticamente significativa ($p < 0,001$). De modo similar, também foi revelado uma maior expressão de uPAR no *front* de invasão em relação ao centro do tumor, estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Tabela 14).

Tabela 14. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, e significância estatística (p) para a imunopositividade para uPA e uPAR em relação ao *front* de invasão e centro do tumor. Natal, RN – 2016.

Marcador	<i>Front</i> de invasão			Centro do tumor		p
	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	
uPA	46	2,00	1,00-3,00	1,00	0,00-2,00	<0,001
uPAR	46	1,00	0,00-2,00	0,00	0,00-1,00	<0,001

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN

5.3.4 Avaliação da correlação entre os marcadores

Quando analisadas possíveis correlações entre as imunoexpressões de uPA e uPAR as imunoexpressões, o teste de correlação de Spearman demonstrou não existir correlação estatisticamente significante entre os marcadores, tanto no *front* de invasão ($r = -0,048$; $p = 0,751$) como no centro do tumor ($r = -0,030$; $p = 0,841$).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O CO é considerado o oitavo tipo de câncer mais comum no mundo, variando segundo a localização geográfica. No Brasil, ele compreende cerca de 3% de todas as neoplasias malignas, havendo, anualmente, cerca de 15.000 novos casos e 5000 mortes (BATISTA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014; INCA, 2016). Dentre os COs, o CEO representa cerca de 90% dos casos. Ele é uma neoplasia maligna, caracterizada pela proliferação de células da camada espinhosa e de caráter extremamente invasivo, com propensão a metástases linfonodais precoces (JOHNSON et al., 2005).

O CE de língua é o mais comum de todos os CEO, no qual mais de 80% dos casos correspondem à língua oral (dois terços anteriores da língua) (ZWETYENGA et al. 2003) e, é considerado o CEO de pior prognóstico devido à alta frequência de metástase linfonodal (LIM, 2006; SANO; MYERS, 2007). Adicionalmente, Bello, Soini e Salo (2010) descrevem o curso clínico do CELO como sendo imprevisível devido às taxas relativamente elevadas de metástase oculta em pacientes que apresentam um pequeno tumor primário sem evidência clínica de metástase linfonodal.

Neste estudo, evidenciou-se uma maior prevalência do CELO em pacientes do sexo masculino (65,2%) e com prevalência na 7ª década de vida, com média de 62,8 anos de idade. Estes dados corroboram outras pesquisas (WARNAKULASURIYA, 2009; OKUYEMI; PICCIRILLO; SPITZNAGEL, 2014; MATSUSHITA et al. 2015). No entanto, de acordo com Rikardsen et al. (2014) há uma tendência da disparidade na relação homem:mulher tornar-se cada vez menos pronunciada, que se deve provavelmente as mulheres estarem se expondo igualmente a agentes cancerígenos, tais como o tabaco e o álcool. (GORSKY et al., 2004; OLIVEIRA; SILVA; ZUCOLOTO, 2006; CHATURVEDI et al., 2008).

Em relação ao estadiamento clínico TNM, foi observado o predomínio dos estágios mais avançados (III e IV) correspondendo a 69,6% dos casos em relação aos estágios mais iniciais (I e II) que representaram 30,4% dos casos. Este achado foi semelhante aos de Krishnamurthy e Ramshankar (2013) e Krishnatreya et al. (2015) que relataram, respectivamente, que 85% e 76,7% da sua amostra se encontrava nos estágios III e IV. Segundo Mccullough, Prasad e Farah (2010) o diagnóstico tardio deste CO ocorre por ele se apresentar usualmente como uma lesão indolor em estágios iniciais, para o qual o paciente só procura um profissional da saúde ao apresentar sintomatologia, além da facilidade que este tumor tem em metastatizar. Ford e Farah (2013) enfatizam a importância da consulta regular

ao dentista para realização de um exame clínico oral eficiente, visto que a detecção precoce do CELO leva a um maior número de casos sendo diagnósticos em estágios iniciais.

No atual trabalho foram considerados apenas os casos de CELO com acompanhamento de 5 anos visto que este é considerado o tempo padrão para analisar a recidiva locorregional e o desfecho desta lesão (OKUYEMI; PICCIRILLO; SPITZNAGEL, 2014; RODRIGUES et al., 2014). Nos estudos de Mäkitie et al. (2007) e Rodrigues et al. (2014) a percentagem de recidiva locorregional em pacientes com CELO foi 28% e 25,7% dos casos, respectivamente, corroborando os achados do presente estudo no qual 30,4% dos casos apresentaram recidiva locorregional. Em relação ao desfecho, óbito foi mais prevalente (55,81%), estando de acordo com outros estudos (MOSLEH-SHIRAZI; MOHAMMADIANPANAH; MOSLEH-SHIRAZI, 2009; VATANASAPT et al. 2011; YEOLE; KURKURE; SUNNY, 2011). Segundo Kademani et al. (2005), é devido as altas taxas de recidiva deste tumor e sua baixa sobrevida que se faz necessário a descoberta de marcadores moleculares que detectem a progressão da doença, assim como, aperfeiçoem o tratamento oncológico.

Em relação à gradação histológica, no presente estudo utilizamos o método proposto por Bryne (1998) por estarmos de acordo com o autor a respeito da importância da avaliação do *front* de invasão, além de ser um método de fácil avaliação e reprodutibilidade. Dentre os casos analisados, no presente estudo, observou-se que a maioria foi classificada como de alto grau (84,8%) sendo apenas 15,2% dos casos classificados como de baixo grau. Estes achados são semelhantes aos de Caldeira, Sousa e Aguiar (2015) que também classificaram a maioria dos casos como alto grau (78,6%). Em relação aos parâmetros morfológicos, foi observado que a maioria dos casos foi classificada como altamente ceratinizado (50%), moderado pleomorfismo (47,8%), dissociação celular ($n < 15$) (80,4%) e moderado infiltrado inflamatório (56,5%).

Estudos a cerca de biomarcadores vêm sendo realizados devido a discrepâncias entre os achados clínicos e histomorfológicos de pesquisadores, estimulando a busca de outros parâmetros indicadores de agressividade das neoplasias. Neste contexto, a invasão tumoral tem sido estudada buscando identificar proteínas chaves que atuem ativamente sobre as células neoplásicas, induzindo a degradação de estruturas extracelulares. À vista disso, a proposta deste trabalho foi analisar a expressão do uPA e uPAR no CELO, relacionando-as com as características clínicas e morfológicas.

O uPA e uPAR são, respectivamente, o ativador e receptor do PAS do tipo uroquinase. Já foi demonstrado o aumento da expressão dessas proteínas em diversos tipos de cânceres

como de mama, estômago, colorretal e ovário (DORN et al., 2011; JELISAVAC-COSIC et al., 2011; LAERUM et al., 2012; BOONSTRA et al., 2014). Acredita-se que a presença desses marcadores no câncer é responsável pela maior infiltração das células malignas em tecido adjacentes, uma vez que a ligação uPA/uPAR estimula a conversão de plasminogênio em plasmina, que por sua vez degrada estruturas da membrana basal e matriz extracelular diretamente como a laminina, colágeno, vitronectina, fibronectina e fibrinas ou indiretamente por meio da ativação de outras enzimas proteolíticas como as MMPs. Além disto, a plasmina também atua ativando diversos tipos de fatores de crescimento como o FGF, VEGF e o TGF- β (ALFANO et al., 2005; DEL ZOPPO, 2010). Devido a isto, diversos trabalhos estudam a relação do uPA e uPAR na patogênese e progressão do câncer através de diversas técnicas laboratoriais como a imuno-histoquímica, ELISA e ensaios celulares, em busca de melhor compreensão da sua importância e atuação no câncer (ALPIZAR-ALPIZAR et al., 2010; CHEN et al., 2011; LANGKILDE et al., 2011; DORN et al., 2011).

Para analisar a expressão imuno-histoquímica do uPA e uPAR variadas técnicas são relatadas na literatura, incluindo a análise quantitativa (BACCHIOCCHI et al. 2008; ZHANG et al. 2011) e a semiquantitativa. A semiquantitativa é descrita de dois modos: avaliando somente a extensão (NOZAKI et al. 1998; INOUE et al., 2007; YOSHIKAWA et al., 2011; BOONSTRA et al., 2014), e avaliando a extensão e intensidade de marcação (YASUDA et al., 1997; MAGNUSSEN et al. 2014). Para este estudo, a análise da imunoexpressão foi semiquantitativa para ambos os marcadores. Além disso, os marcadores foram também avaliados no *front* de invasão e centro do tumor na busca de melhores resultados a serem obtidos no estudo.

Analisando a imunoexpressão do uPA, foi observado que 93,5% dos casos apresentaram imunopositividade no *front* de invasão, dentre os quais a maioria foi classificado como escore 2 (34,8%), enquanto que 67,4% dos casos apresentaram imunopositividade no centro do tumor, com predominância do escore 1 (32,6%). Os testes utilizados não revelaram significância estatística em relação à metástase linfonodal e o estadiamento clínico. Estes resultados foram discordantes dos encontrados por Samouelian et al. (2008) e Liu et al. (2011) em carcinoma de endométrio e de pulmão, respectivamente, que ao observarem uma maior expressão do uPA nos casos de tumores que apresentavam metástase linfonodal no momento do diagnóstico, sugeriram que esta protease poderia auxiliar na melhora da especificidade do diagnóstico molecular, nos casos com envolvimento linfonodal. Assim como, no CELO, Zhang et al. (2011) observaram uma maior expressão do uPA nos casos com presença de metástase linfonodal e estágio clínico mais avançado, afirmando que ele parece ter

participação na progressão neoplásica. Porém, de forma similar aos nossos achados, estudos realizados por Hundsdoerfer et al. (2004), Gershtein et al. (2010) e Magnussen et al. (2014) em CEO não relataram associação entre estes parâmetros e a imunoeexpressão do uPA. Gershtein et al. (2010) afirmam que esta ausência de relação não significa que o uPA não esteja associado a carcinogênese, uma vez que eles observaram uma maior expressão do uPA em tecido tumoral em relação a tecido de mucosa oral normal, sugerindo uma importante participação dessa proteína no CEO.

No que se refere à expressão de uPA em relação à recidiva e desfecho do tumor, na presente pesquisa, também, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. De modo similar, estudo realizado por Tang et al. (2001) em carcinoma esofágico também não encontrou associação entre a expressão de uPA e a sobrevida, sugerindo que neste tipo de carcinoma esta proteína parece não estar possuir valor prognóstico. Em contrapartida, estudos como o de Yoshiwaza et al. (2011) e Fuessel et al. (2014) em CEO e em carcinoma renal, respectivamente, observaram uma maior sobrevida nos casos com uma menor expressão de uPA, assim como, os estudos de Harris et al. (2007) e Kumano et al. (2009) em câncer de mama e próstata, respectivamente, observaram uma menor recidiva nos casos com menor expressão de uPA. Apesar da ausência de associação entre a expressão do uPA e os parâmetros clínicos na presente pesquisa, observamos sua expressão na maioria dos casos, especialmente no *front* de invasão, o que nos sugere sua presença ativa no CELO.

Em relação à gradação histológica, foi observado, no *front* de invasão, maior imunomarcção de uPA nos casos com alto grau de malignidade, quando comparados aos de baixo grau de malignidade, nos fornecendo assim, resultados estatisticamente significativos. Especificamente quando analisada a sua expressão em relação aos parâmetros morfológicos, foi observado uma diferença estatisticamente significativa em relação ao padrão de invasão, no qual, os casos com dissociação celular ($n < 15$) apresentaram maior expressão de uPA. Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Jelisavac-Cosic et al. (2011) em câncer de mama onde os casos que apresentavam uma maior expressão de uPA foram positivamente relacionados aos tumores pobremente diferenciados. No CEO, Nozaki et al. (1998), Inoue et al. (2007) e Yoshizawa et al. (2011) relataram que os casos com maior expressão de uPA apresentavam o pior padrão de invasão, caracterizado por uma distribuição difusa e em cordões das células neoplásicas. Assim, estes autores sugeriram que o uPA pode servir como um biomarcador para avaliar a progressão desta neoplasia. Adicionalmente, Nozaki et al. (1998) relata que a associação do padrão de invasão a expressão de uPA no CEO, indica a

participação desta proteína como uma enzima proteolítica que ocasiona a destruição de estruturas vitais para a manutenção da integridade epitelial.

Segundo Costa, Araújo Júnior e Ramos (2005), o padrão de invasão é um critério de importante valor prognóstico, uma vez que ele representa um reflexo da capacidade de coesão das células neoplásicas, sugerindo que neoplasias bem-diferenciadas invadem em um padrão com margens bem definidas, enquanto que, os tumores mais anaplásicos invadem em pequenos agregados celulares ou como células isoladas, sendo estes mais agressivos. Adicionalmente, Bundgaard et al. (2002) afirmam que o padrão de invasão é o componente mais importante do sistema de gradação histológica de malignidade quando avaliado o prognóstico do CEO. Baseado nos nossos resultados, acreditamos que o aumento da expressão do uPA nos casos de alto grau de malignidade e pior padrão de invasão, tenha um papel importante no processo de invasão das células neoplásicas do CELO.

Em relação ao uPAR, foi observado que 73,9% dos casos apresentaram imunopositividade no *front* de invasão, dentre os quais a maioria foi classificada como escore 1 (45,7%) e 47,5% dos casos apresentaram imunopositividade no centro do tumor, sendo a maioria classificada como escore 0 (54,4%). De modo geral, sua expressão foi baixa corroborando os achados de Nozaki et al. (1998), no qual apenas 29,4% dos casos apresentaram imunomarcção acima de 20% contra 28,3% dos nossos resultados quando levado em consideração somente os casos classificados como escore 2 e 3. Nossos resultados revelaram que a presença de recidiva foi relacionada estatisticamente com maior imunomarcção do uPAR, corroborando o estudo de Memarzadeh et al. (2002) e Kita et al. (2009) em câncer endometrial e câncer gástrico, respectivamente, onde observaram um aumento da ocorrência de recidivas nos casos com maior expressão do uPAR, sugerindo sua participação na agressividade da lesão.

Por outro lado, não houve significância estatística em relação ao estadiamento clínico TNM, desfecho da lesão e gradação histológica. De modo similar, o estudo de Andres, Edwards e Wittliff (2012) em câncer de mama também não encontrou associação com o estadiamento clínico e gradação histológica de malignidade. Todavia, Baker et al. (2007), Inoue et al. (2007) e Magnussen et al. (2014) avaliando casos de CEO observaram resultados estatisticamente significativos entre a expressão de uPAR e o tamanho do tumor e a metástase linfonodal, sugerindo que esse marcador pode ser usado para avaliar a agressividade da lesão. Assim como, Bacchiochi et al. (2008) observaram uma maior expressão do uPAR em casos classificados como pobremente diferenciados segundo a gradação da OMS, sugerindo o uso dessa proteína como um potencial biomarcador de prognóstico.

Analisando a imunoeexpressão dos marcadores em relação à região do tumor, foi observada uma maior imunoeexpressão do uPA e uPAR no *front* de invasão em relação ao centro do tumor, exibindo significância estatística. Este achado indica que a expressão de ambos os marcadores é alterada em decorrência da região tumoral no qual, para ambos, a maior atividade ocorre na região mais profunda do tumor. Embora este tenha sido o primeiro estudo a avaliar a expressão dessas proteínas nessas duas regiões neoplásicas, outros estudos (LINDBERG; LARSSON; NIELSEN, 2006; BACCHIOCHI et al. 2008; ZHANG et al., 2011) já tinham observado este evento, afirmando estar de acordo com o conceito de que características morfológicas e funcionais no *front* de invasão elucidam melhor o comportamento agressivo do CEO. Além disto, Bacchiochi et al. (2008) afirmam que esses marcadores fazem parte de um sistema proteolítico que desempenha papel crucial na invasão celular do CEO, degradando componentes da membrana basal e da matriz extracelular e por isto estão presentes, principalmente, na região mais profunda do tumor. Diante o exposto, acreditamos que o *front* de invasão reflita melhor o comportamento biológico dessas proteínas no CELO.

Na presente pesquisa, quando analisada a correlação entre a expressão do uPA e uPAR, no *front* de invasão e centro do tumor, não foi observada significância estatística, no qual, de modo geral, foi observada uma maior expressão do uPA em relação ao uPAR. Segundo Kwaan, Mazar e Mchon (2013), o uPAR é altamente suscetível à clivagem entre os seus domínios, de modo que, quando há a interação uPA/uPAR, pode ocorrer a clivagem tanto entre seus domínios (DI, DII e DIII), assim como, pode ocorrer a clivagem do uPAR da membrana plasmática, sendo este liberado no meio extracelular sob forma solúvel. Isto poderia explicar a ausência de correlação entre esses dois marcadores no presente estudo, favorecendo a realização de outras investigações para melhor elucidação dos mecanismos associados ao uPA e uPAR.

Estudos prévios em tumores malignos demonstram que os componentes do PAS do tipo uroquinase, uPA e uPAR, parecem atuar na regulação da invasão tumoral, contribuindo para um pior prognóstico. De modo geral, no nosso estudo, a maior expressão do uPA nos casos de alto grau de malignidade e padrão de invasão de dissociação celular, e a maior expressão do uPAR nos casos com presença de recidiva sugere que esses marcadores podem estar envolvidos na progressão do CELO.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se concluir que:

- A imunoexpressão do uPA não mostrou associação com os parâmetros clínicos (metástase linfonodal, estadiamento clínico TNM, recidiva e desfecho), assim como a imunoexpressão do uPAR não mostrou associação com a metástase linfonodal, estadiamento clínico, desfecho e gradação histológica de malignidade.
- A expressão elevada do uPA na amostra estudada, nos casos de alto grau de malignidade em relação aos de baixo grau de malignidade, assim como, nos casos de padrão de invasão de dissociação celular ($n < 15$) em relação ao padrão de bandas e/ou trabéculas sólidas e pequenos grupos ou cordões ($n > 15$), sugere que esta proteína pode estar associada à agressividade morfológica do CELO.
- A expressão elevada de uPAR nos casos com recidiva em relação aos sem recidiva, sugere que este marcador pode estar associado à agressividade da lesão.
- A maior expressão do uPA e uPAR no *front* de invasão em relação ao centro tumoral, sugere a participação dessas proteínas no processo de invasão tumoral e indica que o *front* de invasão reflete melhor o comportamento biológico dessas proteínas no CELO.
- De modo geral, os resultados denotam que o uPA e uPAR podem ter participação na progressão do CELO.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE GHISO, J. A.; KOVALSKI, K.; OSSOWSKI, L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. **J. Cell Biol.**, v. 147, n. 1, p. 89–104, 1999.
- ALFANO, D. et al. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. **Thromb. Haemost.**, v. 93, n. 2, p. 205-11, 2005.
- ALPIZAR-ALPIZAR, W. et al. Urokinase plasminogen activator receptor is expressed in invasive cells in gastric carcinomas from high- and low-risk countries. **Int. J. Cancer**, v. 126, n. 2, p. 405–15, 2010.
- ALPIZAR-ALPIZAR, W. et al. Urokinase plasminogen activator receptor on invasive cancer cells: a prognostic factor in distal gastric adenocarcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 131, n. 4, p. e329–36, 2012.
- AISINA, R. B.; MUKHAMETOVA, L. I. Structure and Function of Plasminogen/Plasmin System. **Russ. J. Bioorg. Chem.**, v. 40, n. 6, p. 590–605, 2014.
- ANDRES, S. A.; EDWARDS, A. B.; WITTLIFF, J. L. Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitor (PAI-1) in human breast carcinomas and their clinical relevance. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 26, n. 2, p. 93-103, 2012.
- ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 92, n. 5, p. 448-68, 1984.
- ANNEROTH, G. ; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, p. 229–49, 1987.
- ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; COSTA, A. L. L.; RAMOS, C. C. F. Clinical-pathological parameters as prognostic indicators in oral squamous cell. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 6, n. 2, p. 125-30, 2006.
- ARAÚJO JÚNIOR, R. F. et al. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 13, n. 6, p. E344–7, 2008.
- BACCHIOCCHI, R. et al. Prognostic value analysis of urokinase-type plasminogen activator receptor in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **BMC Cancer**, v. 8, p. 220, 2008.
- BAKER, E. A. et al. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 45, n. 8, p. 623-7, 2007.

BATISTA et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n. 3, p. e74-9, 2010.

BELLO, I. O.; SOINI, Y.; SALO, T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). **Oral Oncol.**, v. 46, n. 9, p. 630–5, 2010.

BETTENDORF, O.; PIFFKÒ, J.; BÀNKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol.**, v. 40, n. 2, p.110-9, 2004.

BHATTACHARYYA, N.; NAYAK, V.K. Survival outcomes for second primary head and neck cancer: a matched analysis. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 132, n. 1, p. 63–8, 2005.

BOONSTRA, M. C. et al. Expression of uPAR in tumor-associated stromal cells is associated with colorectal cancer patient prognosis: a TMA study. **BMC Cancer**, v. 17, n.14, p. 269, 2014.

BOYLE, P. et al. Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review. **J. R. Soc. Med.**, v. 83, n. 11, p. 724–30, 1990.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margins status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 167-78, 2005.

BRODERS, A. C. Squamous-cell ephitelioma of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 6, n. 10, p. 656-64, 1920.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 18, n. 8, p. 432-37, 1989.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v.166, n.4, p.375-81, 1992.

BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for the prognostication? **Oral Dis.**, v. 4, n. 2, p. 70-7, 1998.

BUNDGAARD, T.; BENTZEN, S. M.; WILDT, J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra oral squamous cell carcinoma. **Eur. J. Cancer Oral Oncol.**, v. 30B, n. 5, p.323–8, 1994.

BUNDGAARD, T. et al. Histopathologic parameters in the evaluation of T1 squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Head & Neck**, v. 24, n. 7, p. 656-60, 2002.

CALDEIRA, P. C.; SOUSA A. A.; AGUIAR, M. C. Differential infiltration of neutrophils in T1-T2 versus T3-T4 oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **BMC Res. Notes**, V. 14, n. 8, p. 569, 2015.

CASELLA, R. et al. Urinary levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the detection of bladder carcinoma. **Cancer**, v. 95, n. 12, p. 2494–9, 2002.

CHATURVEDI, A. K. et al. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 4, p. 612-9, 2008.

CHEN, Q. et al. Detection of cathepsin B, cathepsin L, cystatin C, urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in the sera of lung cancer patients. **Oncol. Lett.**, v. 2, n. 4, p. 693-9, 2011.

CHU, Q. D. et al. Overexpression of urinary plasminogen activator (uPA) protein and mRNA in thyroid carcinogenesis. **Diagnostic Mol. Pathol.**, v. 13, n. 4, p. 241-6, 2004.

COSTA, A. L. L.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; RAMOS, C. C. F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v.71, n. 2, p. 181-7, 2005.

DASS, K. et al. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, n. 2, p. 122-36, 2008.

DEL VECCHIO, S. et al. Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography: Comparison with urokinase levels. **Cancer Res.**, v. 53, n. 13, p. 3198-3206, 1993.

DEL ZOPPO, G. J. Plasminogen activators in ischemic stroke: Introduction. **Stroke**, v. 41, n. 10, p. S39-S41, 2010.

D'ALESSIO, S.; GERASI, L.; BLASI, F. uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro. **J. Cell Sci.**, v. 121, n. 23, p. 3922-32, 2008.

DORN, J. et al. Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer. **Ann Oncol.**, v. 22, n. 4, p. 877-83, 2011.

DUFFY, M. J. et al. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. **Cancer**, v. 62, n. 3, p. 531-3, 1988.

DUFFY, M. J.; DUGGAN, C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualized management of patients with cancer. **Clin. Biochem.**, v. 37, n. 7, p. 541-8, 2004.

EDEN, G. et al. The urokinase receptor interactome. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, n. 19, p. 1874-89, 2011.

ECKE, T. H. et al. Four tumour markers for urinary bladder cancer-tissue polypeptide antigen (TPA), HER-2/neu (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation. **Anticancer Res.**, v. 25, n. 1B, p. 635-41, 2005.

EZZAT, A. et al. Frequency and distribution of 22836 adult cancer cases referred to King Faisal Specialist Hospital and Research Center. **Ann Saudi Med.**, v. 16, n. 2, p. 152-8, 1996.

FORD, P. J.; FARAH, C. S. Review Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. **J. Cancer Policy**, v. 1, n. 1–2, p. e2–7, 2013.

FOWLER, B. et al. Binding of human single chain urokinase to Chinese Hamster Ovary cells and cloning of hamster u-PAR. **Thromb. Haemost.**, v. 80, n. 1, p. 148–54, 1998.

FUESSEL, S. et al. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator system components in clear cell renal cell carcinoma patients without distant metastasis. **BMC Cancer**, v. 14, p. 974, 2014.

GERSHTEIN, E. S. et al. Urokinase and Tissue Plasminogen Activators and Their PAI-1 Inhibitor in Tumors of Patients with Oral Mucosal Cancer: Relationship with the Main Clinical Morphological Factors. **Bull Exp. Biol. Med.**, v. 149, n. 3, p. 327–50, 2010.

GONDI, C. S. et al. Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway. **Intern. J. Oncol.**, v. 31, n. 1, p.19–27, 2007.

GORSKY, M. et al. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 98, n. 5, p. 546–52, 2004.

HARRIS, L. et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 33, p. 5287–312, 2007.

HERSZENYI, L. et al. Serum cathepsin B and plasma urokinase-type plasminogen activator levels in gastrointestinal tract cancers. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 17, n. 5, p. 438–45, 2008.

HUBER, M. A.; KRAUT, N.; BEUG, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, n. 5, p.548–58, 2005.

HUNDSDORFER, B. et al. Comparison of urokinase type plasminogen activators (uPA) and plasminogen activator inhibitors (PAI-1) in primary resection of oral squamous cell carcinoma. **Mund Kiefer Gesichtschir.**, v. 8, n. 3, p. 180–90, 2004.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>>. Acesso em: 12 out. 2015.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

INOUE, Y. et al. Expression of urokinase-tupe plasminogen activator (uPA), uPA Receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Sci. Intern.**, v. 4, n. 1, p. 38–44, 2007.

JELISAVAC-COSIC, S. et al. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in patients with primary invasive ductal breast carcinoma—A 7.5-year follow-up study. **Tumori**, v. 97, n. 4, p.532–9, 2011.

JERJES, W. et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. **Head Neck Oncol.**, v. 20, n. 2, p. 9, 2010.

JO, M. et al. Reversibility of epithelialmesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptordependent cell signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 34, p. 22825–33, 2009.

JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. IARC Press: Lyon, p. 168-76, 2005.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and etiology. **Periodontol.** 2000, v. 57, n. 1, p. 19-37, 2011.

KADEMANI, D. et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. **J Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 11, p. 1599-605, 2005.

KADEMANI, D. et al. Analysis of death certification in patients with early stage oral cavity squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, n. 6, p. 1191-97, 2007.

KANTOLA, S. et al. Prognostic factors in tongue cancer – relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. **Brit. J. Cancer**, v. 83, n. 5, p. 614–9, 2000.

KIM, S. J. et al. uPA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. **Anticancer Res.**, v. 22, n.1A, p. 387–93, 2002.

KITA, Y. et al. Expression of uPAR mRNA in peripheral blood is a favorite marker for metastasis in gastric cancer cases. **Br. J. Cancer**, v. 100, n. 1, p. 153–9, 2009.

KRISHNAMURTHY, A.; RAMSHANKAR, V. Early stage oral tongue cancer among non-tobacco users - an increasing trend observed in a south Indian patient population presenting at a single centre. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 14, n. 9, p. 5061-65, 2013.

KRISHNATREYA, M. et al. Characteristics of oral tongue and base of the tongue cancer: a hospital cancer registry based analysis. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 16, n. 4, p. 1371-4, 2015.

KRUPALA, J. L.; GIANOLI, G. J. Carcinoma of the oral tongue. **J. La State Med. Soc.**, v. 145, n. 10, p. 421-6, 1993.

KUMANO, M. et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator system in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. **Urol Oncol.**, v. 27, n. 2, p. 180–6, 2009.

KUROKAWA et al. Predictive Markers for Late Cervical Lymph Node Metastasis in Patients with N0 Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Asian J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 18, n. 2, p. 120–6, 2006.

KWAAN, H. C.; MAZAR, A. P.; MCHON, B. J. The apparent uPA/PAI-1 paradox in cancer: more than meets the eye. **Semin Thromb. Hemost.**, v. 39, n. 4, p. 382-91, 2013.

LAERUM, O. D. et al. Prognosis in adenocarcinomas of lower oesophagus, gastro-esophageal junction and cardia evaluated by uPAR-immunohistochemistry. **Int J. Cancer**, v. 131, n. 3, p. 558–69, 2012.

LARSEN, S. R. et al. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol. Med.**, v. 38, n. 8, p. 657-62, 2009.

LINDBERG, P.; LARSSON, A.; NIELSEN, B. S. Expression of plasminogen activator inhibitor-1, urokinase receptor and laminin gamma-2 chain is an early coordinated event in incipient oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 118, n. 12, p. 2948–56, 2006.

LINDENBLATT, R. C. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. **J Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 1, p. 34-9, 2012.

LANGKILDE, A. et al. Increased plasma soluble uPAR level is a risk marker of respiratory cancer in initially cancer-free individuals. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 20, n. 4, p. 609–18, 2011.

LESTER, R. D. et al. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. **J. Cell Biol.**, v. 178, n. 3, p. 425–36, 2007.

LIM, M.S. Re: Correlational of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, by Kim S-H, Cho NH, Kim K, et al. **J. Surg. Oncol.**, v. 93, n. 4, p. 253–4, 2006.

LIJNEN, H. R. Elements of the fibrinolytic system. **Ann NY. Acad. Sci.**, v. 936, p. 226–36, 2001.

LIU, D. et al. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. **Cancer Cell**, v. 1, n. 5, p. 445–57, 2002.

LIU, Y. et al. An immunohistochemical analysis-based decision tree model for estimating the risk of lymphatic metastasis in pN0 squamous cell carcinomas of the lung. **Histopathology**, v. 59, n. 5, p. 882–891, 2011.

MAGNUSSEN, S. et al. Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are potential predictive biomarkers in early stage oral squamous cell carcinomas (OSCC). **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101895, 2014.

MATSUSHITA, Y. et al. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 44, n. 5, p. 543-8, 2015.

MARKOPOULOS, A. K. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. **Open Dent. J.**, v. 6, p. 126–30, 2012.

MÄKITIE, A. A. et al. Oral tongue carcinoma and its treatment in Finland. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 264, n. 3, p. 263–7, 2007.

MEKKAWAY, A. H.; POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. **Med. Res. Rev.**, v. 34, n. 5, p. 918-56, 2014.

MCCULLOUGH, M. J; PRASAD, G.; FARAH, C. S. Oral mucosal malignancy and potentially malignant lesions: an update on the epidemiology, risk factors, diagnosis and management. **Aust. Dent. J.**, v. 55, n. 1, p. 61-5, 2010.

MEMARZADEH, S. et al. Urokinase plasminogen activator receptor: Prognostic biomarker for endometrial cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 16, p. 10647–52, 2002.

MILANESE, G. et al. Increased urokinase-type plasminogen activator receptor and epidermal growth factor receptor in serum of patients with prostate cancer. **J. Urol.**, v. 181, n. 3, p. 1393–400, 2009.

MINOO, P. et al. Urokinase-type plasminogen activator is a marker of aggressive phenotype and an independent prognostic factor in mismatch repair-proficient colorectal cancer. **Hum. Pathol.**, v. 41, n. 1, p. 70–8, 2010.

MONAGHAN-BENSON, E.; MCKEOWN-LONGO, P. J. Urokinase-type plasminogen activator receptor regulates a novel pathway of fibronectin matrix assembly requiring Src-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 14, p. 9450–9, 2006.

MOSLEH-SHIRAZI, M. S.; MOHAMMADIANPANAH, M.; MOSLEH-SHIRAZI, M. A. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: a 25-year, single institution experience. **J Laryngol. Otol.**, v. 123, n. 1, p. 114–20, 2009.

NEMES, J. A. et al. Oral cancer report from Northeastern Hungary. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 14, n. 1, p.85-92, 2008.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J. Clin.**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

NEVILLE, B. W. et al. Patologia Epitelial. In: NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2009. Cap. 10. p. 410-23.

NOZAKI, S. et al. Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis. **Oral Oncol.**, v. 34, n. 1, p. 58-62, 1998.

NOZAKI, S. et al. Inhibition of invasion and metastasis in oral cancer by targeting urokinase-type plasminogen activator receptor. **Oral Oncol.**, v. 41, n. 10, p. 971-7, 2005.

O-CHAROENRAT, T. P. et al. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. **Oral Oncol.**, v. 39, n. 4, p. 386-90, 2003.

OKUYEMI, O. T.; PICCIRILLO, J. F.; SPITZNAGEL, E. TNM staging compared with a new clinicopathological model in predicting oral tongue squamous cell carcinoma survival. **Head Neck**, v. 36, n. 10, p. 1481-9, 2014.

OLIVEIRA, R.; SILVA, A. R.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermoide oral em uma população brasileira. **J Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 5, p. 385-92, 2006.

PIERGA, J. Y. et al. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. **Int. J. Cancer**, v. 114, n. 2, p. 291–8, 2005.

QUADRI et al. Oral squamous cell carcinoma and associated risk factors in jazan, saudi arabia: a hospital based case control study. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 16, n. 10, p. 4335-8, 2015.

RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 7, p. 489-501, 2003.

RIKARSEN, O. G. et al. Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway: a retrospective study. **BMC Oral Health**, v. 18, n. 14, p. 103, 2014.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncol. Lett.**, v. 8, n. 1, p. 7-11, 2014.

RODRIGUES, P. C. et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, n. 7, p. 795-801, 2014.

RONNE, E. et al. The receptor for urokinase plasminogen activator is present in plasma from healthy donors and elevated in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Br. J. Haematol.**, v. 89, n. 3, p. 576–81, 1995.

SAMOUELIAN, V. et al. Measurement of mRNA of 11 biomarkers by RT-PCR to detect lymph node involvement in cervical cancer. **Int. J. Biol. Markers**, v. 23, n. 2, p. 74-82, 2008.

SANO, D.; MYERS, J. N. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 26, n. 3–4, p. 645–62, 2007.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer—a review. **Int J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 32, n. 3, p. 233-45, 2003.

SCHMITT, M. et al. Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. **Biomed. Biochim. Acta**, v. 50, n. 4–6, p. 731–41, 1991.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiological and clinical implications. **Oral Dis.**, v. 15, n. 6, p. 388-99, 2009.

SHAW, R. J. et al. Prognostic importance of site in squamous cell carcinoma of buccal mucosa. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 47, n. 5, p. 356-9, 2009.

SILVEIRA, E. J. D. et al. Correlation of Clinical, Histological, and Cytokeratin Profiles of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue With Prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376-83, 2007.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumors**. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

SORIO, C. et al. Elevated urinary levels of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in pancreatic ductal adenocarcinoma identify a clinically high-risk group. **BMC Cancer**, v. 11, p. 448, 2011.

SPARANO, A. et al. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 131, n. 4, p. 472-6, 2004.

STINGONE, J. A. et al. Racial differences in the relationship between tobacco, alcohol, and squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Causes Control.**, v. 24, n. 4, p. 649-64, 2013.

STEPANOVA, V. V.; TKACHUK, V. A. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. **Biochemistry (Mosc)**, v. 67, n. 1, p.109-18, 2002.

TAN, W. J. et al. Prognostic significance of invasion depth in oral tongue squamous cell carcinoma. **ORL J Otorhinolaryngol. Relat. Spec.**, v. 74, n. 5, p. 264-70, 2012.

TANG, W. H. et al. Serine proteinase activation in esophageal cancer. **Anticancer Res.**, v. 21, n. 4A, p. 2249-58, 2001.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I.S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 31, n. 10, p. 598-604, 2002.

ULISSE, S. et al. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 32-71, 2009.

VAN DEN BREKEL, M. W. M.; CASTELIJNS, J. A.; SNOW, G. B. Diagnostic evaluation of the neck. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 31, n. 4, p. 601-20, 1998.

VOLM, M.; MATTERN, J.; KOOMAGI, R. Relationship of urokinase and urokinase receptor in non-small cell lung cancer to proliferation, angiogenesis, metastasis and patient survival. **Oncol. Rep.**, v. 6, n. 3, p. 611-15, 1999.

YAMAMOTO, E. ; MIYAKAWA, A. ; KOHAMA, G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head Neck Surg.**, v. 6, n. 5, p. 938-47, 1984.

YASUDA, T. et al. Localization of plasminogen activators and their inhibitor in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Head Neck**, v. 19, n. 7, p. 611-6, 1997.

YEBRA, M. et al. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin α 5 β 1-directed cell migration. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 46, p. 29393-9, 1996.

YEOLE, B. B. ; KURKURE, A. P. ; SUNNY, L. Cancer survival in Mumbai (Bombay), India, 1992-1999. **IARC Sci. Publ.**, v. 162, p. 133-42, 2011.

YUASA-NAKAGAWA, K. et al. Cervical lymph node metastasis from early-stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Acta Otolaryngol.**, v. 133, n. 5, p. 544-51, 2013.

YOSHIZAWA, K. et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor and maspin in oral squamous cell carcinoma: Association with mode of invasion and clinicopathological factors. **Oncol Rep.**, v. 26, n. 6, p. 1555-60, 2011.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, 2009.

WARNAKULASURIYA, S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 6, p. 407-10, 2010.

WEBBER, C. et al. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. **Int. J. Cancer.**, v. 135, n. 2, p. 371-8, 2014.

WEI, Y. et al. Urokinase receptors promote β 1 integrin function through interactions with integrin α 3 β 1. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, n. 10, p. 2975-86, 2001.

WENG, C. J. et al. Impact of uPA system gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors to carcinogenesis and the development of clinicopathology of oral cancer. **Ann Surg. Oncol.**, v. 18, n. 3, p. 805-12, 2011.

VATANASAPT, P. et al. Epidemiology of oral and pharyngeal cancers in Khon Kaen, Thailand: a high incidence in females. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 12, n. 10, p. 2505-8, 2011.

ZHANG, Z. et al. Survey of risk factors contributed to lymphatic metastasis in patients with oral tongue cancer by immunohistochemistry. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 40, n. 2, p. 127-34, 2011.

ZWETYENGA, N. et al. Squamous-cell carcinoma of the tongue: treatment results and prognosis. **Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.**, v. 104, n. 1, p. 10-7, 2003.

APÊNDICE A – SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Natal, 13 de Julho de 2015

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Ilma Sra. Coordenadora
Mariana Gurgel do A. Furtado
Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Northeriograndense Contra o Câncer**

Venho por meio desta, solicitar a liberação de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do trabalho de pesquisa intitulada “Expressão imunoistoquímica de marcadores associados a invasão em carcinoma epidermóide de língua”, em razão do exposto abaixo. A presente pesquisa não trará nenhum risco ou dano direto ou indireto aos sujeitos envolvidos, pois serão utilizadas lâminas de vidro contendo cortes histológicos de materiais biológicos provenientes de biópsias, acondicionados e armazenados sob a forma de blocos parafinados. Além disso, supõe-se provável impossibilidade de contato com alguns dos sujeitos envolvidos para a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo em vista que será utilizado material armazenado há um longo período de tempo passado. Também, em nenhum momento o nome dos pacientes será identificado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Leão Pereira Pinto
Pesquisador Responsável

APÊNDICE B - Ficha de coleta dos dados referentes aos pacientes portadores de CEL.

FICHA CLÍNICA

Nº do prontuário: _____

Nº no bloco: _____

Nome do paciente: _____

Idade: _____ **Data de nascimento:** ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino

Estadiamento clínico: T____ N____ M____

Data da biópsia excisional: ____/____/____

Data do início do tratamento: ____/____/____

Tratamento recebido: () [1-cirurgia; 2-radioterapia; 3-quimioterapia]

Metástase linfonodal: () SIM () NÃO **Data:** ____/____/____

Metástase à distância: () SIM () NÃO **Data:** ____/____/____

Em caso de SIM, informar o local: _____

Recidiva locorregional: () SIM () NÃO **Data:** ____/____/____

Estado da doença () [1-remissão completa; 2-remissão parcial; 3-doença estável; 4-doença em progresso; 5-óbito por câncer; 6-óbito não por câncer]

Data do último seguimento () **ou Data de óbito** () ____/____/____

Outras informações

Bebe?

Sim () Não () **Quantidade dose/dia:** _____ **Por quanto tempo:** _____

Fuma?

Sim () Não () **Quantidade cigarro/dia:** _____ **Por quanto tempo:** _____

APÊNDICE E - Resultados Complementares

A) Caracterização da amostra

Tabela 1 – Perfil clínico dos 46 casos de CELO. Natal-RN, 2016.

Parâmetro	n (%)
Gênero	
Masculino	30 (65,2)
Feminino	16 (34,8)
Idade	
Abaixo dos 60 anos	21 (45,7)
60 anos ou mais	25 (54,3)
Tabagismo	
Não	7 (15,2)
Sim	36 (78,3)
Não informado	3 (6,5)
Etilista	
Não	11 (23,9)
Sim	25 (54,3)
Não informado	10 (21,7)
Estágio clínico do tumor	
I ou II	14 (30,4)
III ou IV	32 (69,6)
Metástase linfonodal	
Ausente	20 (43,5)
Presente	26 (56,5)
Metástase à distância	
Não	42 (91,3)
Sim	4 (8,7)
Recidiva locorregional	
Não	32 (69,6)
Sim	14 (30,4)
Desfecho da lesão	
Remissão	19 (41,3)
Óbito	24 (52,2)
Em progressão	3 (6,5)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Tabela 2 - Distribuição absoluta e relativa dos casos de CELO quanto à metástase linfonodal, recidiva locorregional e desfecho da lesão de acordo com o estadiamento clínico TNM. Natal – RN, 2016.

Parâmetro	Estadiamento clínico		Total	$p^{(1)}$
	I e II	III e IV		
Metástase linfonodal				
Ausente	14 (70)	6 (30)	20 (100)	<0,0001
Presente	0 (0)	26 (100)	26 (100)	
Recidiva locorregional				
Ausente	11 (34,4)	21 (65,6)	32 (100)	0,497
Presente	3 (21,4)	11 (78,6)	14 (100)	
Desfecho				
Remissão	7 (36,8)	12 (63,2)	19 (100)	0,314
Óbito	5 (20,8)	19 (79,2)	24 (100)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

(1): Teste exato de *Fisher*

Tabela 3 - Distribuição absoluta e relativa dos casos de CELO quanto à recidiva locorregional e desfecho da lesão de acordo com a metástase linfonodal. Natal – RN, 2016.

Parâmetro	Metástase linfonodal		Total	<i>p</i>
	Ausente	Presente		
Recidiva locorregional				
Ausente	15 (46,9)	17 (53,1)	32 (100)	0,535 ⁽¹⁾
Presente	5 (35,7)	9 (64,3)	14 (100)	
Desfecho				
Remissão	10 (52,6)	9 (47,4)	19 (100)	0,203 ⁽²⁾
Óbito	8 (33,3)	16 (66,7)	24 (100)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

(1): Teste exato de *Fisher*

(2): Teste Qui-quadrado de Pearson

Tabela 4 - Distribuição absoluta e relativa dos casos de CELO quanto ao desfecho da lesão de acordo com a recidiva. Natal – RN, 2016.

Parâmetro	Recidiva		Total	$p^{(1)}$
	Ausente	Presente		
Desfecho				
Remissão	17 (89,5)	2 (10,5)	19 (100,0)	0,039
Óbito	14 (58,3)	10 (41,7)	24 (100,0)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

(1): Teste exato de *Fisher*

B) Aspectos morfológicos

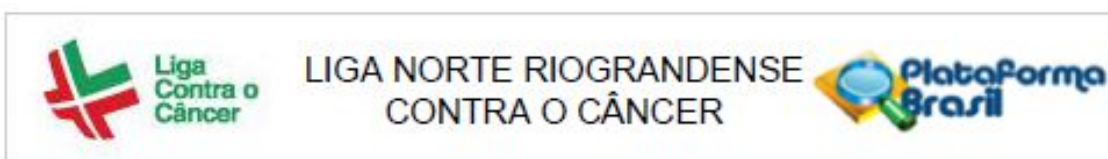
Tabela 5 - Distribuição absoluta e relativa dos casos de CELO quanto ao estadiamento clínico TNM, metástase linfonodal, recidiva locorregional e desfecho de acordo com a gradação histológica de Bryne (1998). Natal – RN, 2016.

Parâmetro clínico	Gradação histológica de Bryn		Total	$p^{(1)}$
	Baixo grau	Alto grau		
Estadiamento clínico TNM				
I e II	2 (14,3)	12 (85,7)	14 (100,	1,00
III e IV	5 (15,6)	27 (84,4)	32 (100,	
Metástase linfonodal				
Ausente	3 (15,0)	17 (85,0)	20 (100,	1,00
Presente	4 (15,4)	22 (84,6)	26 (100,	
Recidiva locorregional				
Ausente	4 (12,5)	28 (87,5)	32 (100,	0,66
Presente	3 (21,4)	11 (78,6)	14 (100,	
Desfecho				
Remissão	2 (10,5)	17 (89,5)	19 (100,	0,68
Óbito	4 (16,7)	20 (83,3)	24 (100,	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

(1): Teste exato de *Fisher*

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão imunoistoquímica de marcadores associados a invasão em carcinoma epidermóide de língua

Pesquisador: Leão Pereira Pinto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 44207915.6.0000.5293

Instituição Proponente: Liga Norte Riograndense Contra o Câncer

Patrocinador Principal: Pós-Graduação em Patologia Oral

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.170.634

Data da Relatoria: 04/08/2015

Apresentação do Projeto:

Já relatado anteriormente.

Objetivo da Pesquisa:

Já relatado anteriormente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já relatado anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foi solicitado a alteração do título da pesquisa pelo fato dos pesquisadores substituírem os marcadores imunoistoquímicos inicialmente proposto. Tal alteração de título, não a afetará a amostra, não trará nenhum risco ou dano aos sujeitos envolvidos e objetivo do projeto continua o mesmo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos entregue e analisados: Emenda e Folha de rosto atualizada

Recomendações:

Informações ao pesquisador: segundo a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa, e resolução nº 466/2012 do CNS, o

Endereço: Rua Dr. Mário Negócio, 2267

Bairro: Quintas

CEP: 59.040-000

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)4009-5494

Fax: (84)4009-5480

E-mail: biblioteca@liga.org.br



LIGA NORTE RIOGRANDENSE
CONTRA O CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.170.634

pesquisador responsável deverá:

1. Entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, na íntegra, por ele assinada;
2. Desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado;
3. Apresentar ao CEP/LNRCC eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa;
4. Apresentar ao CEP/Liga relatório parcial (a cada 6 meses) e final após conclusão da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não possui pendência e nem lista de inadequação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

OBS: Informamos também que nenhum membro da Equipe de Pesquisa do estudo participou e também não aprovou ou expressou sua opinião através de procuração a membros do CEP para análise, aprovação ou não, dos documentos referidos.

NATAL, 05 de Agosto de 2015

Assinado por:
Andréa Carla
(Coordenador)

Endereço: Rua Dr. Mário Negócio, 2267

Bairro: Quintas

CEP: 59.040-000

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)4009-5494

Fax: (84)4009-5480

E-mail: biblioteca@liga.org.br